

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND

Füüsika instituut

Marit Puusepp

***RHODOBACTER SPHAEROIDES*'E OLIGOMEERSE
VALGUST NEELAVA KOMPLEKSI LH1
DISSOTSIATSIOON KÕRGE HÜDROSTAATILISE RÕHU
TOIMEL**

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Juhendajad: Liina Kangur, MSc

prof Arvi Freiberg

Kaitsmisele lubatud

allkiri, kuupäev

Tartu 2013

Sisukord

Lühendid ja akronüümid.....	4
1 Sissejuhatus.....	5
2 Valdkonna ülevaade.....	6
2.1 <i>Rhodobacter sphaeroides</i>'e fotosünteesiline ühik.....	6
2.1.1 <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	6
2.1.2 Fotosünteesiline ühik.....	6
2.1.3 Fotosünteesi pigmendid	7
2.1.4 Valgust neelava kompleksi I struktuur	8
2.1.5 Valgust neelava kompleksi I funktsionaalsed erisused.....	10
2.2 Rõhu toime bioloogilistele süsteemidele.....	11
2.2.1 Elu kõrge hüdrostaatilise rõhu tingimustes.....	11
2.2.2 Kõrge rõhu eelised	12
2.2.3 Valgud kõrge rõhu tingimustes	13
3 Materjal ja metoodika.....	16
3.1 LH1 proov.....	16
3.2 Rõhurakk	16
3.3 Optilised süsteemid.....	17
3.4 Andmete töötlemine.....	19
3.4.1 Rõhuandmete töötlemine.....	19
3.4.2 Neeldumisspektrite töötlemine.....	20
4 Tulemused ja järeldused	22
4.1 Detergendi ja valgu suhe	22
4.2 LH1 dissotsiatsioon dimeeriks	22
4.2.1 LH1 neeldumisspektri muutused ajas.....	22
4.2.2 LH1 dissotsiatsiooni mehhanism.....	25
4.2.3 Reaktsiooni järk.....	28
4.2.4 Kineetilised parameetrid.....	30
4.3 LH1 dissotsiatsioon monomeeriks B777	33

4.3.1	Kaheastmeline dissotsiatsioon	33
4.3.2	Vaheastmeta dissotsiatsioon	36
Kokkuvõte		38
Tänuavaldused.....		40
High hydrostatic pressure induced dissociation of oligomeric light-harvesting complex LH1 from <i>Rhodobacter sphaeroides</i>		41
Kasutatud kirjanduse loetelu		43
Lisa 1. LH1 neeldumisspektrid		47
Lisa 2. Oktüülglükosiidi faasiüleminek		48

Lühendid ja akronüümid

Bchl	ingl <i>bacteriochlorophyll</i> , bakterklorofüll
CCD	ingl <i>Charge-Coupled Device</i> , laengsidestusseadis
DHPC	ingl <i>1,2-diheptanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine</i> , 1,2-diheptanoüül- <i>sn</i> -glütsero-3-fosfokoliin
EDTA	etüleendiamiintetraatsetaat
H-side	vesinikside
LH	ingl <i>Light-Harvesting Complex</i> , valgust neelav kompleks
LH1	ingl <i>Light-Harvesting Complex I</i> , valgust neelav kompleks I
LH2	ingl <i>Light-Harvesting Complex II</i> , valgust neelav kompleks II
OD	ingl <i>Optical Density</i> , optiline tihedus (neeldumine)
<i>Rb. sphaeroides</i>	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>
RC	ingl <i>Reaction Centre</i> , reaktsioonitsenter

1 Sissejuhatus

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärk on uurida purpurbakteri *Rhodobacter (Rb.) sphaeroides*'e fotosünteesilises ühikus oleva valgust neelava kompleksi I (LH1) dissotsiatsiooni kõrge hüdrostaatilise rõhu toimel. LH1 on oligomeerne integraalne membraanivalk. Hüpoteesi kohaselt dissotsieerub LH1 rõhu toimel heterodimeeridest koosnevateks alamühikuteks. Seni on uuritud vaid üksikute ensüümide struktuuri stabiilsust rõhu all (Brindley *et al.* 2008, Ohmae *et al.* 2007). Autorile teadaolevalt ei ole kunagi varem rõhu all uuritud ühegi integraalse membraanivalgu dissotsiatsiooni subühikuteks.

Töö olulisus tuleneb ühelt poolt töö täielikust uudsusest, teisalt uurimisobjektist. Pärast rakulise elu algust Maa ookeanide põhjas hüdrotermaallõõrides umbes 4 miljardit aastat tagasi tekkis fotosüntees (Daniel, Oger ja Winter 2006). *Rb. sphaeroides* on hea mudelorganism fotosünteesivate organismide kujunemise ja evolutsiooni uurimiseks. Fotosünteesi kui nähtuse tähtsust evolutsioonis on raske üle hinnata. Seetõttu on oluline teada bakteriaalses fotosünteesis võtmepositsioonil oleva valgust neelava kompleksi LH1 struktuuri stabiilsust ja muutusi kõrge hüdrostaatilise rõhu all, mis valitseb ka ookeanide põhjas.

Töö eesmärgi täitmiseks omandas autor kõigepealt teemantalasi-rõhuraku ning optilise süsteemi kokkupanemise ja kasutamise metoodika. Autor sisestas uuritava proovi rõhurakku ning mõõtis mitme ööpäeva jooksul valgu ja selle dissotsieerunud komponentide neeldumisspektrite ribade intensiivsuste muutusi. Paralleelselt mõõtis töö autor korduvalt rõhurakus olevat rõhku. Katseseeria käigus varieeriti rõhku, erijuhtudel ka temperatuuri ning detergendi kontsentratsiooni. Spektrijoonte muutuste analüüsi abil tuvastas autor, et oligomeerne valk LH1 dissotsieerub rõhu toimel alamühikuteks, dissotsiatsiooni mehhanism sõltub rõhust ning on kirjanduse andmetele tuginedes seostatav detergendi faasisiiretega.

2 Valdkonna ülevaade

2.1 *Rhodobacter sphaeroides*'e fotosünteesiline ühik

2.1.1 *Rhodobacter sphaeroides*

Rhodobacter sphaeroides on purpurne mitteväävlibakter. Purpurbakterite fotosünteesi on uuritud juba üle 60 aasta ning *Rb. sphaeroides* on üks tuntumaid mudelorganisme selles vallas (Chang, Meyer ja Loach 1990; Hu *et al.* 2002; Freiberg 2006; Cogdell, Gall ja Köhler 2006). Purpursed mitteväävlibakterid on anaeroobsed ning asustavad tiikide, järvede ja ojade põhjakihte. Kuna rohelised taimed ning vetikad kasutavad ära spektri sinise (~450 nm) ning punase (~700 nm) osa, on *Rb. sphaeroides* evolutsiooni käigus kohastunud kasutama spektri rohelist ning lähi-infrapunapiirkonda. (Cogdell, Gall ja Köhler 2006) Purpurbakter *Rb. sphaeroides*'e fotosünteesi pigmentideks on bakterklorofüll (Bchl) a ja karotenoidid (Hu *et al.* 2002).

Kui rohelistes taimedes redutseerub fotosünteesi käigus oksüdeeritud klorofüll vee molekulide arvel (põhjustades vee fotolüüsi, mille tulemusel vabaneb molekulaarne hapnik), siis purpursetes mitteväävlibakterites kasutatakse molekulaarset vesinikku. Kuna fotosünteesi käigus ei teki hapnikku, nimetatakse purpurbakterite fotosünteesi anoksügeenseks. (Freiberg 2006; Hu *et al.* 2002; Cogdell, Gall ja Köhler 2006)

2.1.2 Fotosünteesiline ühik

Fotosünteesilise ühiku moodustab reaktsioonitsenter koos seda ümbritsevate valgust neelavate kompleksidega (LH). Valgust neelav kompleks I e LH1 (ingl *Light-Harvesting Complex I*) on fotosünteesiline pigmendikompleks. LH1 neelab rakule langeva päikese kiirguse footonid ning ergastub nende arvel. Ergastusenergia kantakse Försteri resonantse energiaülekande abil edasi reaktsioonitsentritele. LH1 ümbritseb otseselt reaktsioonitsentrit, seevastu valgust neelavad kompleksid II (LH2) asuvad tsentrist kaugemal ning kannavad oma energia üle LH1-le. Iga valgust neelavat kompleksi I ümbritseb sõltuvalt keskkonnatingimustest (temperatuur ja valgusolud) kuni 10 LH2 ringi. (Hu *et al.* 2002)

Valgust neelavaid komplekse nimetatakse antennideks: nad kontsentreerivad footonite energia reaktsioonitsentrisse, mis ka ise neelab footoneid (Hu *et al.* 2002). Fotosünteesilised ühikud muudavad valguse kogumise palju efektiivsemaks (~95%) kui reaktsioonitsentrid üksi suudaksid: antennid laiendavad neelatavate footonite spektraalvahemikku, suurendavad valguse neeldumise ristlõikepindala ning võimaldavad efektiivset fotosünteesi laias kiirguse intensiivsusevahemikus (Hu ja Schulten 1998; Cogdell, Gall ja Köhler 2006). Üks fotosünteesiline ühik sisaldab ligikaudu 300 bakterklorofüllit ja 200 karotenoidi molekuli (Hu *et al.* 2002).

Reaktsioonitsentri bakterklorofüllide oküdatsioon käivitab elektronide transpordiahela, mille käigus viiakse vesinikioonid periplasmaatilisse ruumi ja tekitatakse prootonite gradient läbi plasmamembraani. Prootonite gradiendi arvel sünteesitakse adenosiintrifosfaati, mis on raku universaalne energiaallikas, sest osaleb enamikus metabolismiradades molekulidevahelise energia ülekandjana. Nii muundatakse elektromagnetenergia keemiliste sidemete energiaks, mida rakk saab kergesti kasutada. (Hu *et al.* 2002; Freiberg 2006; Cogdell, Gall ja Köhler 2006)

2.1.3 Fotosünteesi pigmendid

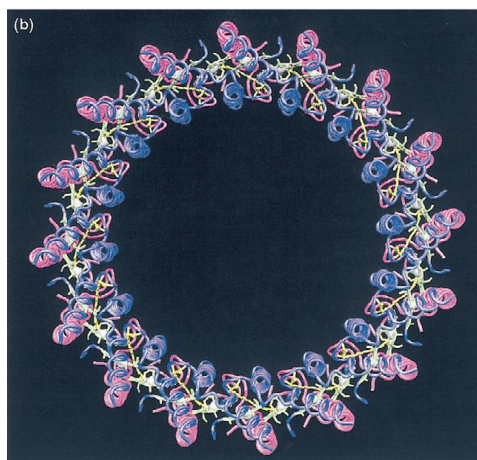
LH1 neeldumismaksimum *in vivo* tavatingimustes on lähi-infrapunases spektri piirkonnas 875 nm juures. Kuna LH1 sisaldab bakterklorofüllit, tuntakse seda lühendi B875 all. LH2 neeldumismaksimumid on lühematel lainepikkustel – 800 ja 850 nm. (Hu *et al.* 2002) *In vivo* pigmentide maksimumid on pikematel lainepikkustel kui *in vitro*, sest membraanis on nad seotud nii omavahel kui valkudega, mis tekitab neeldumisspektris punanihke. Seega on võimalik ühe ja sama pigmendi oligomeriseerumisel ja seostumisel valkudega peenhäälestada selle neeldumisspektrit. (Cogdell, Gall ja Köhler 2006)

Energiatasemete erinevus LH pigmentide vahel (mis on osaliselt saavutatud ka peenhäälestuse tulemusel) paneb ergastuse liikuma kõrgema energiaga molekulidelt madalama energianivoo ehk reaktsioonitsentri suunas (Hu *et al.* 2002). Ergastuse ülekande täpset mehhanismi on võimalik selgitada kvantmehaanika ning -keemia abil (Cogdell, Gall ja Köhler 2006). Ergastusenergia ülekanded fotosünteesiliste pigmentide vahel toimuvad vähem kui pikosekundiga (Hu *et al.* 2002).

Bakterklorofüll a molekulil on külghelaks enamasti fütool, kuid võib esineda ka geranüülgeraniool (Cogdell, Gall ja Köhler 2006). *Rb. sphaeroides*'e LH1 sisaldab karotenoide sferoideen ja sferoidenoon. LH1-s on bakterklorofüll ja karotenoidide suhe 1:1. (Hu ja Schulten 1998)

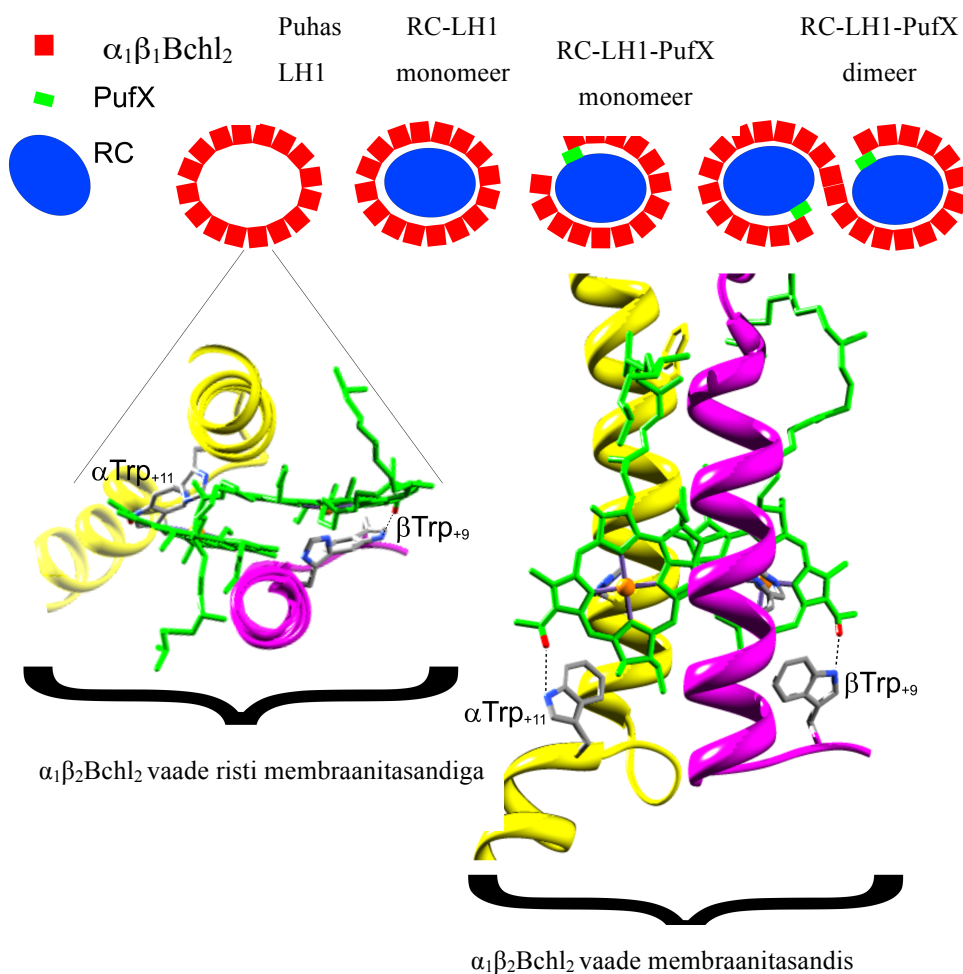
2.1.4 Valgust neelava kompleksi I struktuur

Valgust neelav kompleks koosneb fotosünteesilistest pigmentidest ja proteiinidest, mis on omavahel mittekovalentselt seotud (Hu *et al.* 2002). LH1 valgulise osa moodustavad madalmolekulaarsed hüdrofoobsed α - ja β -apoproteiinid. α - ja β -apoproteiinide paarid oligomeriseeruvad ja moodustavad toese nendega mittekovalentselt seotud pigmentidele. (Cogdell, Gall ja Köhler 2006) Hu ja Schulten (1998) on arvutuslikult näidanud, et LH1 on ringikujuline heksadekameer (vt joonist 1), mis koosneb $\alpha\beta$ -apoproteiinide heterodimeeridest. Tulemus on kooskõlas varasemate ja hilisemate uuringutega, kuigi röntgenkristallograafia, aatomjõu- ja krüoelektronmikroskoopia uuringud ei ole seni LH1 keerulisuse tõttu kõiki selleteemalisi vaidlusi täielikult lahendanud (Bahatyrova *et al.* 2004; Cogdell, Gall ja Köhler 2006).



Joonis 1. Hu ja Schulteni (1998) arvutuslikult modelleeritud LH1 mudel. Ringikujuline LH1 koosneb 16 $\alpha\beta$ -apoproteiinide ja bakterklorofüll heterodimeerist.

Rb. sphaeroides’e α - ja β -apoproteiin koosnevad vastavalt 58 ja 49 aminohappejäägist ning on mõlemad põhiosas α -helikaalse sekundaarstruktuuriga (vt joonist 2). Iga apoproteiinide dimeer seob kaks bakterklorofüllit ja 2 karotenoidi molekuli. Heterodimeeri $\alpha_1\beta_1\text{Bchl}_2$ nimetatakse tema neeldumismaksimumi järgi B820-ks. (Hu ja Schulten 1998) Wang *et al.* (2003) on LH1 üksikute komponentide assotsieerumisel demonstreerinud, et $\beta_2\text{Bchl}_2$ kompleksid neelavad samuti 820 nm juures, kuid α -apoproteiinide olemasolul on tugevalt eelistatud heterodimeeri teke. Seetõttu võib $\beta_2\text{Bchl}_2$ kogust lugeda tühiseks võrreldes heterodimeeri B820-ga.



Joonis 2. LH1 struktuur. Metsiktüübi LH1 on avatud kaheksa kujuline dimeer: ringide keskel on reaktsioonitsenter (RC) ning täisringide moodustumist takistab PufX valg. Käesolevas töös on uuritud vaid puhast, ilma PufX ja reaktsioonitsentrita LH1 kompleksi. Iga LH1 koosneb 16 heterodimeerist, mis omakorda koosnevad 2 apoproteiinist ja nendega üle Trp vesiniksidemetega seotud bakterklorofüllit (Bchl) molekulidest. Allikas: mugandatud Freiberg *et al.* (2012) autorite loal.

LH1-s moodustavad 32 bakterklorofüll a molekuli membraani tasandil ringi (vt joonist 1), mille keskel asub fotosünteesiline reaktsioonitsenter. Reaktsioonitsenter sisaldab nii bakterklorofüll a kui karotenoidide molekule. (Freiberg 2006; Hu *et al.* 2002)

Hu ja Schulteni (1998) mudeli kohaselt (vt joonist 1) moodustavad α -apoproteiinid LH1 sisemise silindri diameetriga 78 Å ja β -apoproteiinide heeliksid välimise ringi läbimõõduga 108 Å. LH1 kogu diameeter sellises mudelis on 118 Å. Bakterklorofüll a molekulid asuvad kahe silindri vahel: heterodimeeridesiseselt on bakterklorofüllide Mg aatomite vahekaugus 9,2 Å ja dimeeride vahel 9,3 Å. Bakterklorofüllide kesksed Mg aatomid on seotud apoproteiinide His jääkidega ning bakterklorofüllide 2-atsetüül-karboksüülgrupi hapniku aatom on vesiniksidemega (H-side) ühenduses Trp jäägiga. Võimalikud on ka nõrgad H-sidemed nimetatud His-de ja bakterklorofüllide 9-ketorühmade vahel. Sellise H-sidemete moodustumise mudeliga on kooskõlas Ramani resonantsspektroskoopias saadud tulemused. (Hu ja Schulten 1998)

2.1.5 Valgust neelava kompleksi I funktsionaalsed erisused

Eelmises peatükis kirjeldatu on lihtsustatud mudel LH1 ja reaktsioonitsentri kompleksi struktuurist, sest *Rb. sphaeroides*'el võib nimetatud kompleks sõltuvalt bakteri fenotüübist olla nii mono- kui dimeerne (vt joonist 2). Monomeersed LH1 kompleksid esinevad PufX valguga mutantidel. (Cogdell, Gall ja Köhler 2006) PufX uuringud on näidanud, et sellel valgul on oluline roll fotosünteesilise ühiku funktsionaalsuse tagamisel, sest LH1 ringi katkestamine ja dimeriseerimine PufX poolt võimaldab ubikinoonil pääseda tagasi tsütokroom bc_1 kompleksi. Ubikinoon ja tsütokroomid on aga olulised elektronide transpordiahela komponendid. (Bahatyrova *et al.* 2004; Cogdell, Gall ja Köhler 2006)

Lisaks on LH1-le iseloomulik suur struktuurine paindlikkus isegi toatemperatuuril (eriti ilma reaktsioonitsentrita), mistõttu Bahatyrova *et al.* (2004) on leidnud avatud ja suletud ringikujuliste struktuuride asemel ka nt ruudu- ja ellipsikujulisi komplekse ning kaari. Veel leidsid Bahatyrova *et al.*, et LH1 ringidel ja ellipsitel on kolm erineva suurusega alavormi, millest keskmisele (ja levinuimale) vastab eespool kirjeldatud 16 subühikuga struktuur, kuid leidub ka 15 ja 18 $\alpha\beta$ -heterodimeeriga ringe/ellipseid.

LH1 struktuuri aitab stabiliseerida selle asukoht: bakterklorofüllid paiknevad ühes tasandis lipiidse kaksikkihi ja periplasma piiril, kus neid hoiavad paigal koordinatsioonisidemed His-i ja vesiniksidemed Trp-dega (vt joonist 2) (Hu ja Schulten 1998). Bahatyrova *et al.* (1998) on aga näidanud, et kuna bakterklorofüllil H-sidemed LH1-s ühendavad ainult üht $\alpha\beta$ -heterodimeeri, siis ilma reaktsioonitsentri stabiliseeriva mõjuta võib LH1 ring lipiidises kaksikkis (ka toatemperatuuril ja detergente kasutamata) dissotsieeruda üksikuteks $\alpha_1\beta_1\text{Bchl}_2$ ühikuteks või paarist ühikust koosnevateks oligomeerideks.

2.2 Rõhu toime bioloogilistele süsteemidele

2.2.1 Elu kõrge hüdrostaatilise rõhu tingimustes

Üks levinuimaid elu tekke hüpoteese ütleb, et elu Maal sai alguse ~4 miljardit aastat tagasi sooja meres, nn protobiootilise supi tingimustes. Hüpoteesi vastu räägib aga asjaolu, et Maa pinnal valitsesid sel perioodil äärmuslikud tingimused: tugev ultraviolet- ja röntgenkiirgus, asteroidide sagedased tabamused, kiired ja suure amplituudiga temperatuuri muutused, ookeanide täielik aurustumine vähemalt ühel korral (Daniel, Oger ja Winter 2006). Lahendusena sellele vastuolule on Daniel, Oger ja Winter välja pakkunud hüpoteesi elu tekkest proto-ookeani põhjas hüdrotermaalsetes lõõrides madala kiirgusdoosi, kõrge hüdrostaatilise rõhu ja stabiilse temperatuuri tingimustes. Vee ja magma vaheliste reaktsioonide käigus tekkivad serpentiini rühma kivimid ja vesinik oleksid muutnud CO_2 metaaniks ja lämmastiku NH_3 -ks – nii oleks loodud lähteained orgaaniliste ühendite tekkeks. Hüpoteesi toetab ka hüpertermofiilsete ja piesofiilsete (kõrget hüdrostaatilist rõhku armastavate) organismide lai levik kõige algelisemate bakterite ja arhede rühmade hulgas. Viimase põhjal oletatakse, et kõigi elusorganismide üldine ühine eellane LUCA oli piesofiil. (Daniel, Oger ja Winter 2006) Seda teooriat toetab fakt, et mingeid spetsiifilisi, kõrge rõhuga kohastumise geene ei ole piesofiilidel seni leitud (Oger ja Jebbar 2010).

62% Maa biosfäärist on üle 0,1 kbar rõhu mõju all (Boonyaratanakornkit, Park ja Clark 2002). Kuni 70% kõigist rakkudest ning 50% primaarsest biomassi produktsioonist toodetakse kõrge rõhu tingimustes (Oger ja Jebbar 2010). Kõrgrõhu-ökosüsteemide uurimine algas aga alles 1940-ndatel ZoBelli ja Johnsoni töödega, kes olid esimesed teadlased, kes suutsid kasvatada piesofiilseid mikroobe labori tingimustes (Johnson ja

Zobel 1949). 1977. aastal avastati hüdrotermaalsed lõõrid ja neid nn “musti suitsetajaid” ümbritsev suur elurikkus. Vesi lõõrides on rikas metallide, vesiniku ja vesiniksulfiidi osas, muutes selle tugevalt redutseerivaks keskkonnaks. Enamik hüdrotermaalsetest lõõridest leitud mikroorganisme on kemolitotroofid, s.t suudavad energiat saada mineraalide keemilisest muundamisest. Tuvastatud on nii aeroobseid baktereid ja arhesid kui ka obligatoorseid anaeroobe. Viimasest järeldub, et “mustade suitsetajate” elukooslused võivad eksisteerida (ja võisid tekkida) sõltumatult päikesevalgusest, fotosünteesist ja hapnikust kui elektronide lõppaktseptorist. (Erauso *et al.* 1993; Daniel, Oger ja Winter 2006; Oger ja Jebbar 2010)

Enamiku mikroorganismide tapmiseks piisab rõhust 2–5 kbar, mis tähendab, et kõrge temperatuuri asemel saaks kasutada toiduainete steriliseerimiseks rõhku. Rõhu poolt tekitatud muutusi elus rakkude metabolismis, genoomi ekspressioonis ja struktuuris on aga nende keerulisuse tõttu vähe uuritud. (Daniel, Oger ja Winter 2006) On teada, et rõhu toimel väheneb membraanide voolavus, viburite liikuvus ja valgusüntees on reeglina inhibeeritud, kuna ribosoomid dissotsieeruvad (Oger ja Jebbar 2010). Süstemaatilisem rõhu mõju uurimine on võimalik üksikute valkude ja nende komplekside tasemel.

2.2.2 Kõrge rõhu eelised

Kõrge rõhu rakendamine bioloogilistele süsteemidele omab mitmeid eeliseid võrreldes temperatuuri muutmisega samades süsteemides. Esiteks võimaldab rõhk lahutada soojushulga ja ruumala muutuste poolt põhjustatud efektid, mis temperatuuri muutmisel jääksid omavahel eristamatuks. Kõrge rõhu katsetes kasutatakse tavaliselt rõhku normaalrõhust kuni 10 kbar-ni. Niisuguses vahemikus ei katke ega muutu molekulisisesed kovalentsed sidemed, s.t et rõhu tõstmisega süsteemis saab kontrollitult muuta biomolekulide tertsiaar- ja kvaternaarstruktuuris üliolulisi mittekovalentseid sidemeid. (Silva ja Weber 1993) Kõrge rõhu all saab teha ka muidu võimatuks osutuvaid madalatemperatuurilisi või superkriitilise oleku katseid (Winter ja Dzwolak 2005; Daniel, Oger ja Winter 2006).

Rõhu-uuringute abil on võimalik leida keemiliste reaktsioonide aktivatsiooni- ja reaktsiooniruumalad, mis annavad olulist informatsiooni reaktsiooni tasakaalu ja

mehhanismi kohta. Le Châtelier' printsiibi kohaselt liigub reaktsiooni tasakaal rõhu all selle oleku suunas, mille ruumala on väiksem, ning kiireneb reaktsioon, mille üleminekuoleku ruumala on väiksem kui lähteolekul. Rõhu-sõltuvuse uurimine võib viia ka uute faaside ja protsesside avastamisele. (Winter ja Dzwolak 2005)

2.2.3 Valgud kõrge rõhu tingimustes

Rõhu all on uuritud monomeersete ensüümide ja vähesel määral ka teiste monomeersete valkude kokku- ja lahtipakkumist (Winter ja Dzwolak 2005; Daniel, Oger ja Winter 2006). Katsed näitasid, et kõrge rõhu toime ei hävi valgu sekundaarstruktuur, küll aga kõrgemat järku struktuurid, mida koos hoidvad hüdrofoobsed interaktsioonid nõrgenevad. Seevastu temperatuuri või keemiliste denaturantide mõjul denatureerub valk täielikult. Seega on rõhk nõrga denatureeriva toimega ja mis veelgi olulisem, rõhu langetamisel toimub enamasti valgu renaturatsioon (Winter ja Dzwolak 2005).

Daniel, Oger ja Winter (2006) on välja toonud, et kuna valgud on 5–10 korda vähem kokkusurutavad kui vesi, on valkude ruumalamuutused rõhu all tavaliselt alla 1%. Ruumala kahanemist tähistab negatiivne aktivatsiooniruumala ΔV^\ddagger . Danieli, Ogeri ja Winteri andmetel denatureeruvad monomeersed valgud 4–8 kbar juures. Seevastu oligomeersed vees lahustuvad proteiinid dissotsieeruvad tavaliselt juba 1–2 kbar juures (Boonyaratanakornkit, Park ja Clark 2002). Tsütoplasmaatiliste valkude puhul on denaturatsioonil oluline ka tsütoplasma teiste komponentide kontsentratsioon. On leitud, et paljud tsütoplasmas lahustuvad ained, nt suhkrud, urea ja soolad, mõjutavad rõhu all valkude stabiilsust, lahustuvust ja konformatsiooni (Winter ja Dzwolak 2005).

Väga paljutootav on kõrge hüdrostaatilise rõhu kasutamine valkude agregaatide ning amüloidide lahtipakkumise uurimiseks. See võib kaasa aidata Alzheimeri ja Parkinsoni tõve ning prioonhaiguste ravi väljatöötamisele. Samuti võib kõrge rõhu kasutamine aidata toota kvaliteetsemaid ravimeid näiteks suhkurtõve patsientide jaoks. (Winter ja Dzwolak 2005; Daniel, Oger ja Winter 2006) Rõhu mõju valkude stabiilsusele on aga kahetine: lisaks denatureerivale efektile võib kõrge rõhk olla ka termostabiliseeriv, s.t et mõned valgud muutuvad rõhu all temperatuuri denatureeriva mõju suhtes tundetumaks (Robb ja Clark

1999; Boonyaratanakornkit, Park ja Clark 2002). See on eriti oluline omadus kuumades hüdrotermaalsetes lõõrides elavate organismide jaoks.

2.2.3.1 Bilipiidsed membraanid ja integraalsed membraanivalgud

Rakumembraanid on oma suure heterogeensuse tõttu äärmiselt kompleksed, polümorfised, dünaamilised ning sõltuvalt koostisest ka rõhu- ja temperatuuritundlikud. Seetõttu kasutatakse membraansete valkude uuringutes tihti kas detergente või kunstlikke bilipiidseid membraane, mis koosnevad vaid üksikutest erinevatest fosfolipiididest ning kus puuduvad teised valgud ja steroolid.

Detergendid on amfipaatsed molekulid: neil on polaarne pea ja hüdrofoobne saba, mille rasvhappejäägid jäljendavad lihtsustatult membraani keskkonda. Tavaliselt on detergendid lühemate rasvhappejääkide ahelatega kui lipiidid. Vesikeskkonnas moodustavad lipiidid ja detergendid sõltuvalt kontsentratsioonist ja temperatuurist kas kerakujulisi mitselle või bilipiidseid membraane. Paljud membraansed valgud lahustuvad detergentidest moodustunud mitsellides kergesti. Vaatamata sellele, et detergendid ja nende looduslikud analoogid lipiidid on väga lihtsustatud mudel reaalsest membraanist, on nende kasutamine membraansete valkude lahustamiseks tehniliselt suhteliselt keeruline (Seddon, Curnow ja Booth 2004).

Lipiidide uuringud on näidanud, et rõhu ning temperatuuri toimel võivad rasvhappejääkide pikkades ahelates esineda faasisiirded (Kaneshina *et al.* 2002; Matsuki *et al.* 2002). Rõhu kasvades toimub üleminek vedelkristall-olekust, kus rasvhappejäägid on korrapäratus konformatsioonis, geelolekusse, kus rasvhappejäägid paiknevad korrapäraselt ja väljasirutunult. Lisaks toimub tihti ka geel-geel siire. (Daniel, Oger ja Winter 2006) Winter ja Dzwolak (2005) on näidanud, et tegelik pilt võib olla veelgi keerulisem, sest nt 1,2-dipalmitoüül-*sn*-glütsero-3-fosfatidüülkoliinil eksisteerib 5 erinevat faasi 6 võimaliku siirdega, mõned küll vaid üle 40 °C juures. Faasiüleminekud koos steroolide lokaalse koosseisu muutumisega võivad Winteri ja Dzwolaki arvates mängida olulist rolli raku ekso- ja endotsütoosis ning teistes rakumembraani struktuurset paindlikkust nõudvates protsessides.

Freiberg *et al.* (2012) uurisid LH1 bakteriklorofülle ja apoproteiine ühendavate vesiniksidemete katkemist kõrge hüdrostaatilise rõhu all. Membraaniga seotud kompleksid olid rõhu suhtes vähetundlikud, samas kui detergentis lahustatud LH1 oli rõhu suhtes oluliselt tundlikum. Integraalsete membraanivalkude uurimisel rõhu all tuleb seega lisaks arvestada lipiidide ja detergentide mõjuga.

Kuigi integraalsed membraanivalgud moodustavad u 30% organismi proteiinidest, on nende uurimine kõigi eelpool kirjeldatud probleemide tõttu väga keeruline ning seda on vähe tehtud: vaid 1% kõigist proteiinide andmepangas (Protein Data Bank) kirjeldatud valkudest on membraansed ning toimemehhanism on teada veelgi vähematel (Seddon, Curnow ja Booth 2004).

2.2.3.2 Oligomeersete valkude dissotsiatsioon

Autorile teadaolevalt ei ole seni kunagi uuritud ei LH1 ega ühegi teise membraanse oligomeerse valgu dissotsiatsiooni rõhu all. Küll aga on saavutatud LH1 dissotsiatsioon B820-ks erinevate detergentide toimel normaaltingimustel (Ghosh, Hauser ja Bachofen 1988; Chang, Meyer ja Loach 1990; Visschers *et al.* 1992; Wang *et al.* 2003).

Valkude denatureerimiseks vajalik rõhk on enamasti suurem kui looduslikes kõrgrõhu-süsteemides eksisteerib, küll aga piisab sellest oligomeersete vees lahustuvate valkude dissotsiatsiooniks (Oger ja Jebbar 2010). Boonyaratanakornkit, Park ja Clark (2002) on leidnud, et oligomeersed vees lahustuvad ensüümid (glütseeraldehüüd-3-fosfaadi, laktaadi ja malaadi dehüdrogenaasid) dissotsieeruvad ja reassotsieeruvad (kohati hüstereesiga) vastavalt rõhu tõstmisel kuni 2 kbar ning tagasi langetamisel. Silva ja Weber (1993) on Arc repressori näitel välja toonud, et oligomeeri dissotsiatsioonil tekkinud monomeere võivad rõhu toimel tabada lisaks ka konformatsioonilised muutused. Suuremate vees lahustuvate oligomeeride dissotsiatsiooni näiteks on Gorovitsi, Ramani ja Horowitzi (1995) uuritud 14 alamühikuga oligomeeri Cpn60 dissotsiatsioon monomeerideks 1,3–2 kbar rõhu all.

Ülal kirjeldatud näidete puhul tuleb arvestada, et dissotsiatsioonil vesikeskkonnas on esmatähtis polaarsete veemolekulide mõju valgule (Boonyaratanakornkit, Park ja Clark 2002). Seega ei saa tulemusi üldistada integraalsetele membraanivalkudele.

3 Materjal ja metoodika

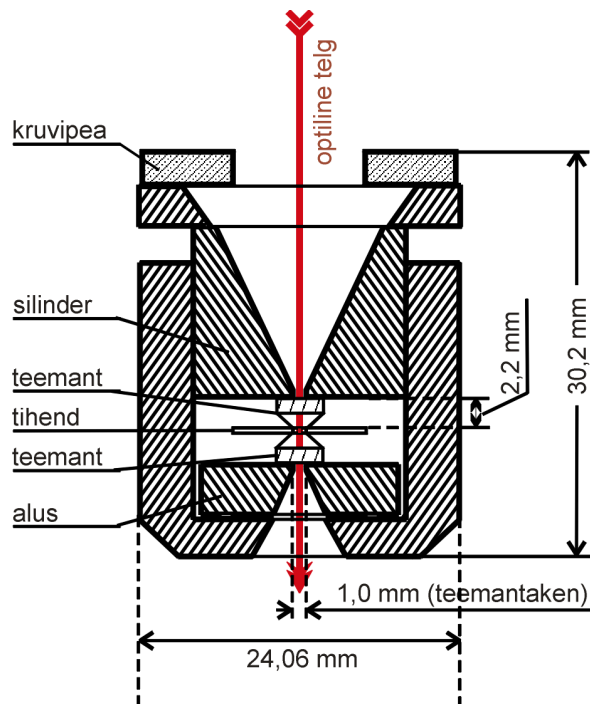
3.1 LH1 proov

Katsetes kasutati puhast LH1 ilma reaktsioonitsentri ning PufX valguta (vt joonist 2). LH1 oli eelnevalt lahustatud puhvris (10 mM Tris-HCl, 1 mM etüleendiamiintetraatsetaat (EDTA), 3 mM 1,2-diheptanoül-*sn*-glütsero-3-fosfokoliin (DHPC), pH=7,9). Tris on rõhustabiilne puhver: selle pH rõhu toimetel praktiliselt ei muutu (Neuman, Kauzmann ja Zipp 1973).

LH1 dissotsiatsiooni võimaldamiseks lisati valgu ja puhvri lahusele 13 mM (ühes katses ka võrdluseks 10 mM) detergendi DHPC. DHPC rasvhappejäägid on lihtsustatud analoog rakumembraani heterogeensele bilipiidsele keskkonnale. Kasutatud detergendi kontsentratsioonid on oluliselt kõrgemad kui kriitiline mitselli moodustamiseks vajalik kontsentratsioon normaaltingimustel (1,4–1,8 mM) (Hauser 2000). Detergendi kontsentratsioon kõigis katsetes oli liias, mis on tavaline praktika kindlustamiseks membraanivalgu lahustumist detergendis (Seddon, Curnow ja Booth 2004).

3.2 Rõhurakk

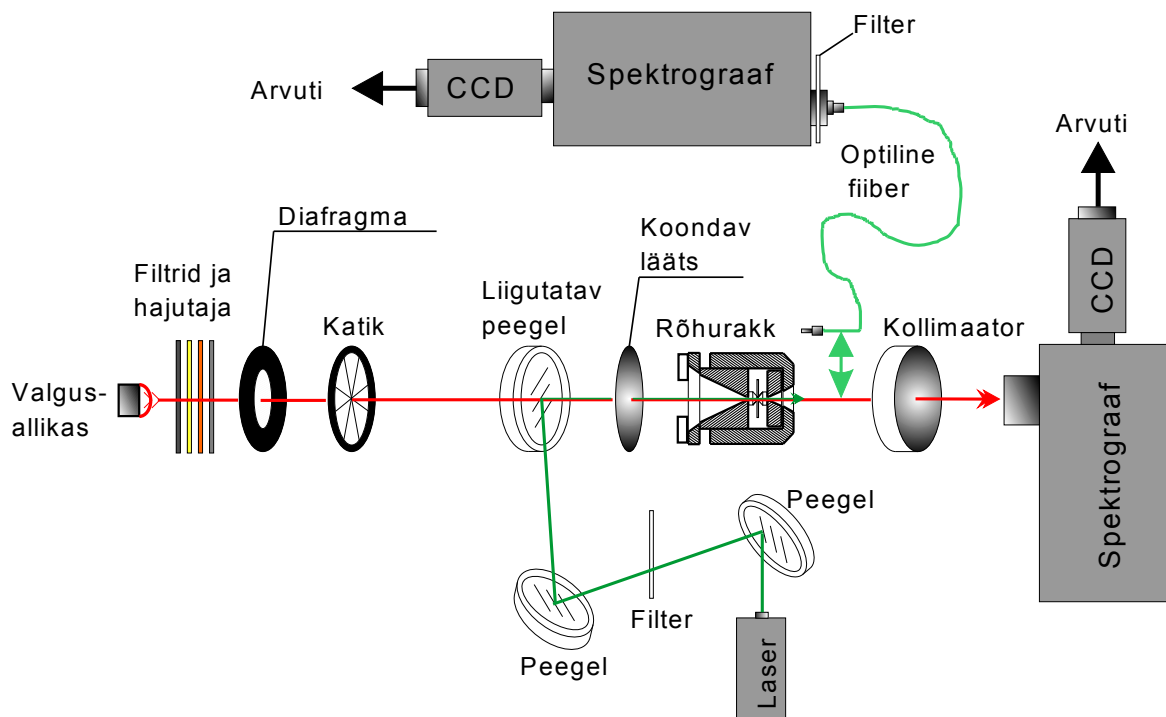
Rõhumõõtmiste katseseeriad sooritati teemantalasi-rõhurakus (vt joonist 3) (D-02, Diacell Products Ltd). Rõhurakk koosneb metallsilindrist, selle kestast ja kaht osa koos hoidvast kaanest, mis kruvitakse raku külge. Kruvide pingutamise tugevusest sõltub teemantalasi-rõhurakus tekkiva hüdrostaatilise rõhu suurus. Nii silindri kui ka rõhuraku kesta pinnale on liimitud teemant. Teemanteid eraldab teineteisest avaga metalltihend. Metalltihendi paksus on 400 µm ning tihendi keskel oleva ava läbimõõt 300 µm. Rakku sisestatava proovi ruumala on alla 0,03 µl. Enne proovi sisestamist asetatakse rakku mikroskoopilised sfäärilised rubiinikristallid (RSA Le Rubis SA), mis toimivad rõhusensorina. Teemantalasi-rõhuraku ettevalmistamine ja kokkupanemine toimus mikroskoobi (MBC-2) all suurendusega 12,5 × 7. Rõhurakk oli kõigi rõhusõltuvuse katsete jooksul LH1 dissotsiatsiooni kiirendamiseks termostateeritud (termostaat Haake Q/F3 80047) 29 °C peale. Minimaalse rõhu (<0,1 kbar) juures sooritatud kontrollkatsed olid termostateeritud vastavalt 15; 20; 25 ja 29 °C peale.



Joonis 3. Teemantalasi-rõhurakk ristlõikes. Proov sisestatakse tihendi poolt tekitatud prooviruumalasse ning surutakse teemantide vahel kokku. Punase noolega on tähistatud optiline telg ja rakku läbiva kiire tee. Liina Kanguri joonist on autori loal mugandanud Marit Puusepp.

3.3 Optilised süsteemid

Katsetes kasutati kaht ühendatud optilist süsteemi, mida kirjeldab joonisel 4 toodud skeem. Esimene süsteem on vajalik LH1 neeldumisspektri mõõtmiseks ning teine rõhu registreerimiseks. Mõlema optilise süsteemi kalibreerimiseks kasutati Ne-lampi, mille gaas sisaldab vähesel hulgal argooni.



Joonis 4. Optilised süsteemid. Katsetes kasutati kaht ühendatud optilist süsteemi: rõhu mõõtmise süsteem (laser, peeglid, filter, lääts, rõhurakk, optiline fiiber, filter ja spektrograafiga ühendatud CCD-kaamera), kus kiire tee on tähistatud rohelisega, ning valgu neeldumisspektri registreerimiseks mõeldud süsteem (valgusallikas, filtrid, hajutaja, diafragma, katik, koondav lääts, kollimaator ja spektrograafiga ühendatud CCD-kaamera), kus kiire tee on tähistatud punasega. Liina Kanguri joonist on autori loal mugandanud Marit Puusepp.

Rõhu mõõtmiseks ergastati mikroskoopilised rubiinikristallid Nd:YAG laseriga lainepikkusel 532 nm. Rubiinide kiirgusspektri lahutas 1,5 m fookuskaugusega Jobin-Yvon TH150 spektrograaf. Spektrograafiga oli ühendatud termoelektriliselt jahutatud CCD-kaamera (EEV30-11, Andor Technology).

Proovi neeldumisspektrite mõõtmiseks kasutati 0,3 m fookuskaugusega Shamrock SR-303i spektrograafi (Andor Technology). Spektrograafis lahutati valgus võrega, millel 150 joont mm kohta ja maksimaalne tundlikkus 800 nm juures. Spektrograafi pilu laius oli 50 μm . Spektrite registreerimiseks kasutati termoelektriliselt jahutatud CCD-kaamerat iDUS DV420A-OE (Andor Technology). Valgusallikaks oli volframist hõõgniidiga (temperatuuril 2700 K) lamp, mille kiire teel olid hajutaja ja filtrid. Neeldumisspektrite mõõtmisteks rõhurakus kasutati filtreid (СССР Государственный Стандарт гост 9411–

66) OC-11 ja OC-12 ning küvetis normaaltingimustel mõõtmiseks lisaks veel filtrit NC-13. Filtrid OC-11 ja -12 lõikavad ära lainepikkused vastavalt kuni 535 ja 555 nanomeetrini ning NC-13 vähendab läbituleva valguse intensiivsust 82% või rohkem kogu uuritavas spektrivahemikus 500–1068 nm.

Automaatse katikuga varustatud süsteem registreeris neeldumisspektri iga 5 minuti järel 2–4 ööpäeva jooksul vastavalt katse tingimustele. Rõhku mõõdeti käsitsi iga katse jaoks kuni 10 korda. Tulenevalt katse käigus avastatud Jobin-Yvon spektrograafi suurest temperatuuritundlikkusest, osutus vajalikuks kalibreerida spektrograaf iga mõõtmise jaoks uuesti.

Detergendi mõju uurimiseks LH1 dissotsiatsioonile vaadeldi rõhurakku sisestatud proovi mikroskoobiga (Olympus IX71) ja fotografeeriti Olympus ColorView IIIu kaameraga. Esialgu <0,1 kbar all olnud rõhurakus tõsteti järk-järgult rõhku, kuni saavutati 4 kbar. Kõik vahetulemused jäädvustati mikroskoobiga ühendatud kaamera abil.

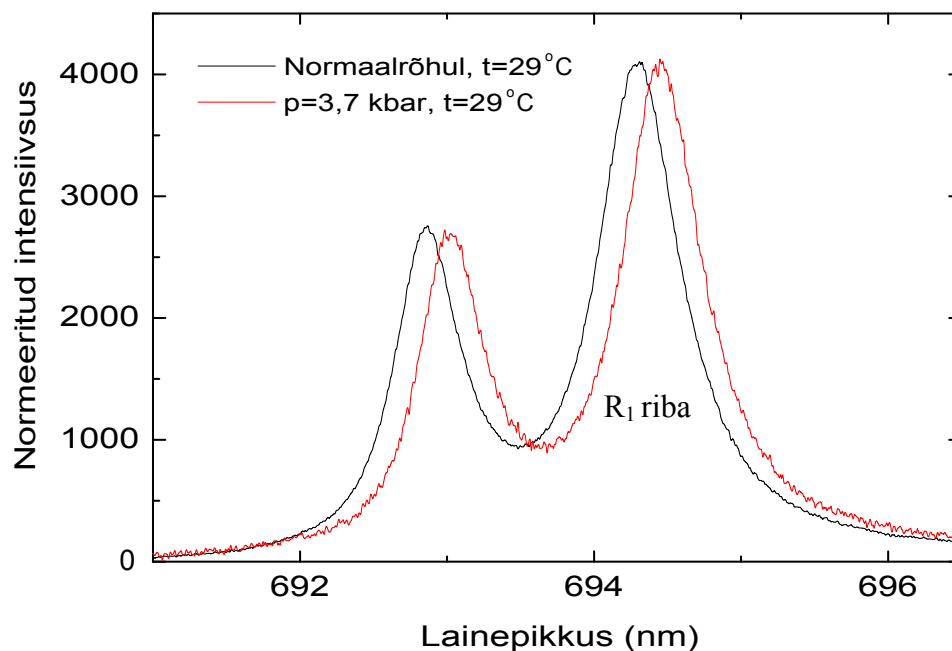
3.4 Andmete töötlemine

Katseandmete töötlemiseks kasutati Microcal Origin 60 programmi. Andmete töötluse võib jagada kaheks sõltumatuks etapiks: rõhu väärtuse leidmiseks ning LH1 neeldumisspektri analüüsiks.

3.4.1 Rõhuandmete töötlemine

Teemantalasi-rõhurakus oleva hüdrostaatilise rõhu määramiseks läbiti alljärgnevad sammud:

1. rubiini kiirgusspektri R_1 riba (vt joonist 5) maksimumi (694,2 nm) asukoha leidmine CCD-kaamera piksliväärtuste skaalas Lorentzi lähenduse abil;
2. CCD-kaamera skaala kalibreerimine reeperlambi Ne-joone (692,94673 nm) ja Ar-joone (696,54307) Lorentzi lähenduste abil leitud maksimumide kaudu;
3. rubiini maksimumile vastava rõhu leidmine kasutades normaalarõhul mõõdetud rubiinide spektreid nullpunktina ning arvestades, et rubiini R_1 riba maksimum nihkub 0,036 nm/kbar (Grasset 2001);
4. leitud väärtuste keskmistamine ja määramatuse hindamine.



Joonis 5. Rubiini kiirgusspektrid normaalarõhul ning 3,7 kbar juures. Mõlemad spektrid on mõõdetud termostateeritud rakus. R_1 riba nihkub rõhu all punasemasse spektripiirkonda.

Statistilise analüüsi kohaselt on rõhu mõõtmisel laiendmääramatus 95%-sel usaldusnivool (kattetegur 1,96) $\pm 0,1$ kbar, kusjuures suurim määramatuse allikas on mõõtevahend ehk spektrograafiga ühendatud CCD-kaamera.

3.4.2 Neeldumisspektrite töötlemine

Kõik LH1 neeldumisspektrid olid mõõdetud referentsspektri suhtes. Referentsspektri mõõtmiseks kasutati puhvrit (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 3 mM DHPC, pH=7,9). Iga katse kohta valiti töötlemiseks 15–20 spektrit. Kuna dissotsiatsioon katse käigus aeglustus, siis esimeste töötlemiseks valitud spektrite ajaline intervall oli 10 minutit, viimaste intervall aga kasvas järk-järgult 10 tunnini. Esmalt korrigeeriti baasjoon kasutades Rayleigh' hajumist ning kalibreeriti lainepikkuste skaala reeperlambi Ne-joone (837,76065 nm) alusel, millele leiti Lorentzi lähendus. Seejärel teisendati lainepikkuste skaala protsessi energeetiliselt paremini kirjeldavaks cm^{-1} skaalaks.

Katsetes, kus LH1 e B875 dissotsieerus dimeeriks B820, normeeriti seejärel spektrialused pindalad, kuna spektrialune pindala väljendab LH1 ning dimeeri summaarset kontsentratsiooni, mis ei tohiks katse jooksul muutuda. Tavaliselt siiski spektrialune pindala kahanes aeglaselt (keskmiselt 20% katse kohta), mis on selgitatav proovi võimaliku lekkimise või osalise oksüdeerumise ja lagunemisega. Lahutades igast spektrist sobiva kordajaga esialgset B875 neeldumisspektrit, leiti puhta B875 optilise tiheduse muutumine ajas. LH1 suhtelise spektrialuse pindala abil määrati oligomeerse valguga suhtelise kontsentratsiooni muutus aja jooksul.

4 Tulemused ja järeldused

4.1 Detergendi ja valgu suhe

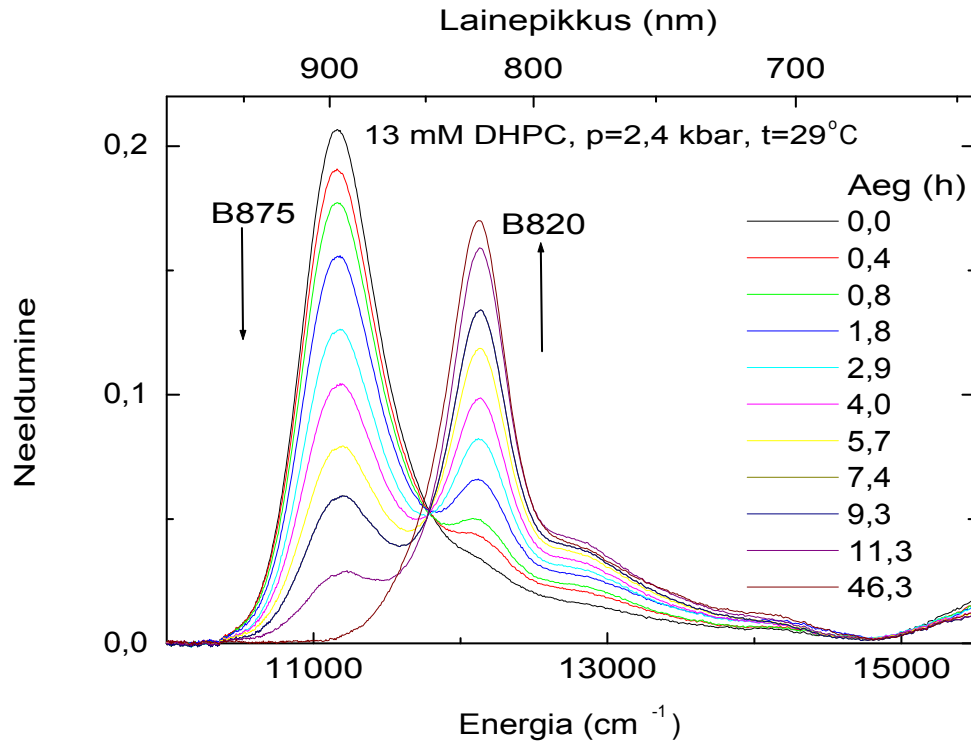
Rb. sphaeroides'e LH1 ektsinktsioonikoefitsient $\varepsilon=118 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ühe bakterklorofüllü kohta oligomeerses LH1 valgus (Sturgis *et al.* 1988). Beer-Lamberti seadusest $A = \varepsilon lc$, kus A tähistab neeldumist ja l optilist teepikkust e rõhuraku tihendi paksust ($l=400 \text{ }\mu\text{m}$), avaldati LH1 kontsentratsioon proovis $c = \frac{A}{\varepsilon l}$. Valgu kontsentratsiooniks saadi $1,49 \text{ }\mu\text{M}$.

Arvestades, et detergendi kontsentratsioon oli katsetes kas 13 või 10 mM, leiti detergendi ja valgu suhe proovis vastavalt 8700:1 või 6700:1 ning detergendi ja heterodimeeri suhe 550:1 või 420:1. Detergendi ja valgu molekulide suhe kindlustab, et dissotsieerunud valgu hüdrofoobsed pinnad on DHPC poolt kaetud. Wang *et al.* (2003) on näidanud, et ühe dimeeri B820 ümber on suurusjärgus 100 n-oktüül- β -D-glükopüranosiidi molekuli.

4.2 LH1 dissotsiatsioon dimeeriks

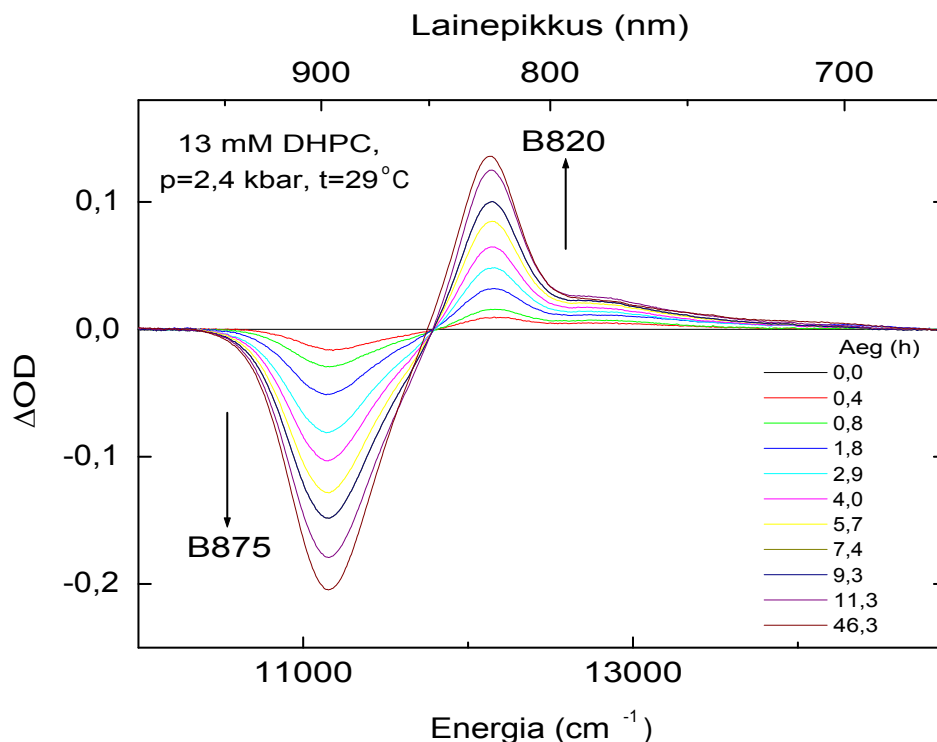
4.2.1 LH1 neeldumisspektri muutused ajas

Joonisel 6 on kujutatud baasjoone osas korrigeeritud neeldumisspektri muutused 2,4 kbar juures tehtud katse jaoks. Graafikul on näha, et B875 ehk LH1 neeldumine väheneb ajas, samas kui heterodimeerile vastava B820 intensiivsus kasvab. Seega toimub kõrge hüdrostaatilise rõhu all LH1 dissotsiatsioon dimeerideks. Tulemus tõestab käesoleva töö esimese hüpoteesi.



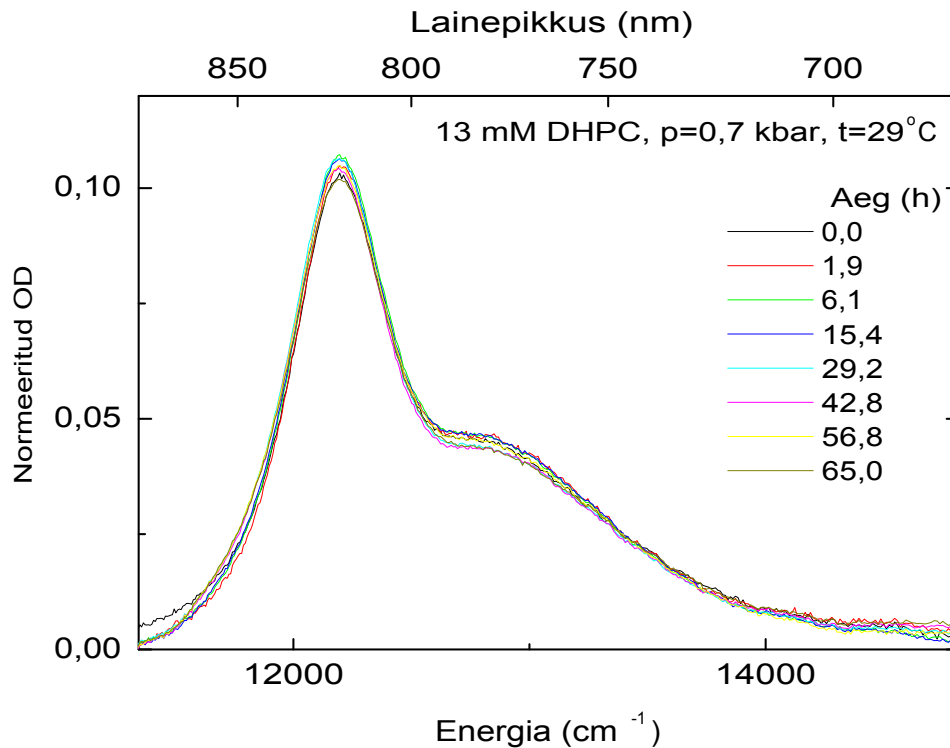
Joonis 6. LH1 neeldumisspektri muutus ajas 2,4 kbar rõhu all 29 °C juures. B875 intensiivsus kahaneb ajas ning selle arvel kasvab dimeeri B820 neeldumine.

Dissotsiatsiooni paremaks illustreerimiseks leiti sama katse jaoks ka diferentsiaalspekter. Joonisel 7 on kujutatud spektri muutumist ajas esialgse neeldumisspektriga võrreldes. Sellel graafikul on selgesti näha B875 kahanemine ning dimeeri optilise tiheduse (OD) kasvamine.



Joonis 7. Optilise tiheduse muut ajas võrreldes hetkel 0 mõõdetud neeldumisspektriga 2,4 kbari ja 29 °C juures. B875 ehk heksadekameeri optiline tihedus langeb ajas, samas kui B820 ehk heterodimeeri neeldumine suureneb.

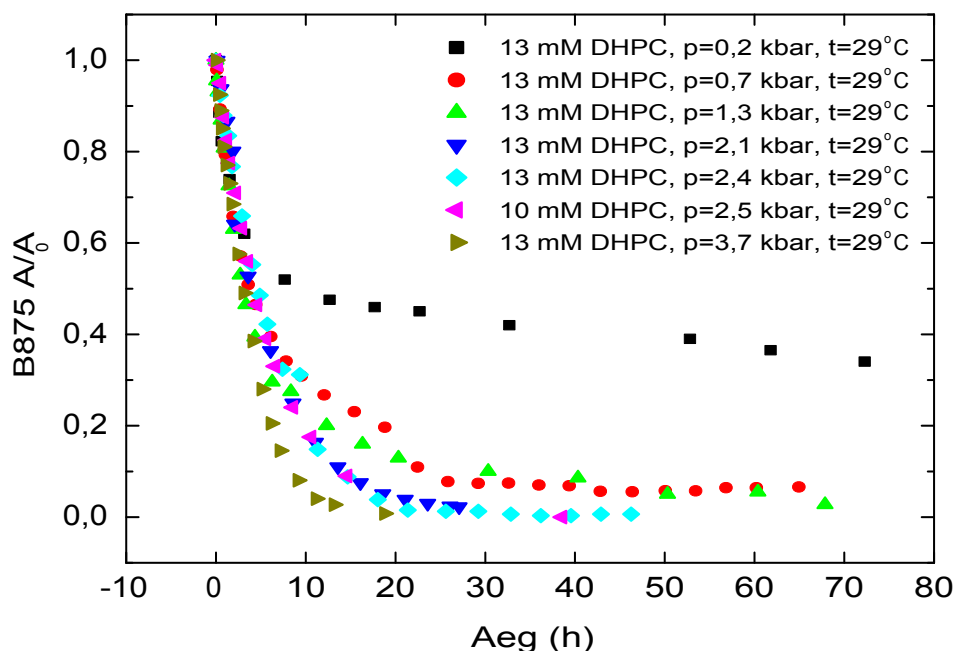
B820 komponendil näib olevat tugev neeldumine bakterklorofüllü monomeeri (B777) piirkonnas. Analüüs näitab, et see nn võnketiib on seotud B820 tekkega, sest nende suhe katse vältel ei muutu (vt joonist 8). Kuna aga erinevates katsetes on 777 nm piirkonna neeldumine erineva intensiivsusega (vt lisa 1), võib algses proovis juba teatud kogus bakterklorofüllü B777 sees olla. Wang *et al.* (2003) poolt leitud *Rhodospirillum rubrum*'i B820-l aga niisugune võnketiib praktiliselt puudus. Seega vajab neeldumine 777 nm piirkonnas edasisi uuringuid.



Joonis 8. Normeeritud B820 neeldumisspektrid erinevatel ajahetkedel 0,7 kbar ja 29 °C juures.

4.2.2 LH1 dissotsiatsiooni mehhanism

Kokku toimus B875 dissotsiatsioon heterodimeeriks 7 erineva rõhu all korraldatud katses. Sama temperatuuri ning detergendi kontsentratsiooni, kuid erinevate rõhkude juures tehtud katsete esialgsed, vaid baasjoone osas korrigeeritud neeldumisspektrid on lisas 1. Kõigi katsete tulemused on kokku võetud joonisel 9.



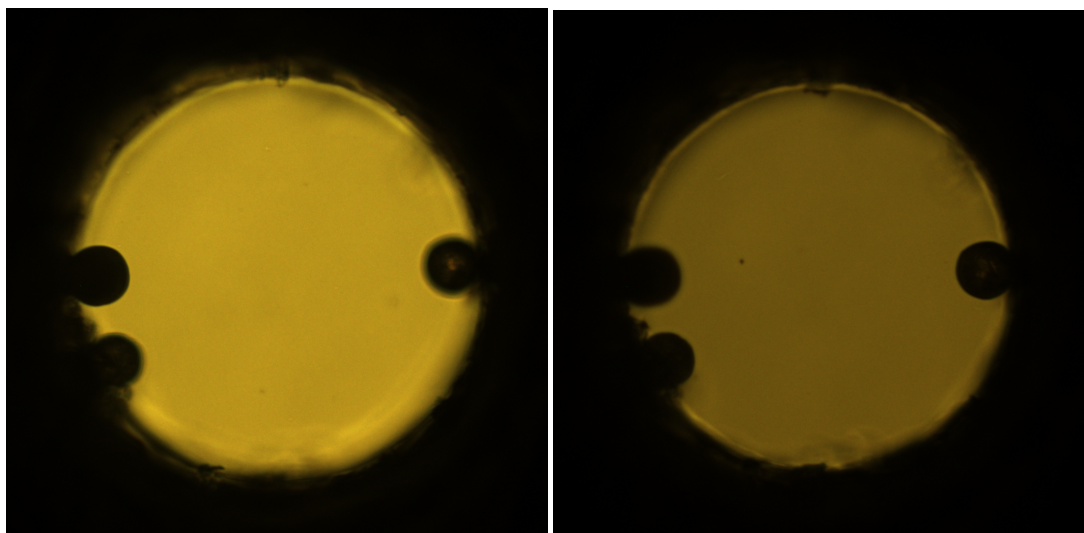
Joonis 9. LH1 heksadekameeri spektrialune suhteline pindala (A/A_0) ajas erinevate rõhkude ja detergendi kontsentratsioonide juures. Eristuvad 0,2; 0,7 ja 1,3; ja üle 2 kbar juures tehtud katsed.

Graafikul on näha B875 suhtelise spektrialuse pindala (A/A_0 , kus A_0 on algpindala) muutused ajas. Teistest eristub 0,2 kbar juures tehtud katse, kus pindalade suhe on oluliselt suurem. Erinevatele platodele jõuavad ka 2,1–3,7 kbar juures ning 0,7–1,3 kbar juures tehtud mõõtmiste tulemused. Sääraseid järske üleminekuid võivad selgitada kasutatud detergendi DHPC rõhust sõltuvad faasisiirded (vt peatükk 2.2.3.1).

Autoril puuduvad andmed 1,2-diheptanoüül-*sn*-glütsero-3-fosfokoliini faasisiirete kohta rõhu all, kuigi tegemist on laialt kasutatava detergendiga. Küll aga on uuritud pikemate ahelatega fosfokoliinide faasisiirdeid (Kaneshina *et al.* 2002; Matsuki *et al.* 2002). Analoogia põhjal võib oletada, et DHPC-l esineb samuti 29 °C juures üks faasisiire 1 ja 2 kbar vahel. Lisaks on Winter ja Dzwolak (2005) näidanud, et ühel fosfokoliinil baseerual pikkade rasvhappeahelatega lipiidil eksisteerib vähemalt 5 erinevat rõhust ning temperatuurist sõltuvat faasi. Suhteliselt lühikeste külgaahelatega detergentide faasiüleminekuid ei ole seni uuritud, kuid käesoleva töö tulemuste põhjal on tõenäoline, et ka DHPC võib omada mitut faasisiiret.

Rakumembraani kanalit moodustava peptiidi gramitsidiin D näitel on tõestatud, et membraanse valgu lisamine võib oluliselt mõjutada bilipiidide faasiüleminekuid, kusjuures mõju on kahepoolne – s.t et lipiidses keskkonnas muutub ka valgu kvaternaarstruktuur vastavalt lipiidi faasile, kuid rõhu toimetel gramitsidiini lahtipakkumist ei toimunud (Winter ja Dzwolak 2005).

Liina Kangur (2011) on uurinud oktüülglükosiidi faasiüleminekuid mikroskoobi all. Visuaalselt tuvastatav siire toimus ~6 kbar juures. Minimaalsel rõhul ning 6 kbar juures tehtud fotod on kujutatud lisas 2. Käesoleva töö autor uuris, kas DHPC faasiüleminekuid on samuti võimalik visuaalselt jälgida. Selleks tehti proovist 12 fotot erinevatel rõhkudel 1–4 kbar vahemikus. Pildid LH1 proovist 13 mM DHPC kontsentratsiooniga minimaalsel rõhul ning 4 kbar juures on kujutatud joonisel 10. Uuritud rõhuvahemikus DHPC faasiüleminekuid visuaalselt tuvastada ei olnud võimalik, mis aga ei välista üleminekute toimumist. DHPC faasisiirete uurimiseks tuleb kasutada tundlikumat meetodikat.



Joonis 10. DHPC faasiüleminekuid visuaalselt tuvastada ei õnnestunud: vasakul minimaalse rõhu juures mikroskoobi all tehtud pilt, paremal 4 kbar juures tehtud foto. Kerakesed piltidel on mikroskoopilised rubiinkristallid, mida kasutati rõhusensoritena.

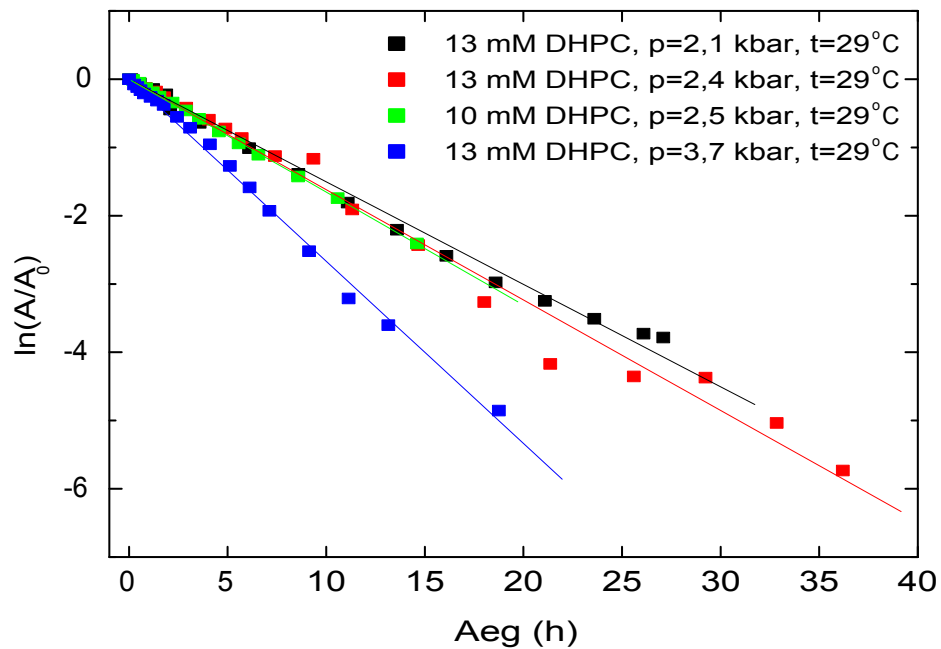
Eelpool toodu põhjal võib järeldada, et LH1 dissotsiatsiooni mehhanism sõltub rõhust ja olulist rolli võib mängida detergendi DHPC faas. Samal ajal võib LH1 lisamine

detergendile muuta viimase faasidiagrammi. Senised tulemused põhinevad LH1 spektrialuse pindala e kontsentratsiooni kahanemisel. Edaspidi võiks uurida dissotsiatsiooni heterodimeeri tekkimise vaatepunktist. Selleks on aga esmalt vaja lähemalt analüüsida B820 võnketiiva ning võimaliku paralleelse monomeerse bakterklorofüllü tekke olemust (vt peatükk 4.2.1) ja leida puhta heterodimeeri neeldumisspektri kuju.

4.2.3 Reaktsiooni järk

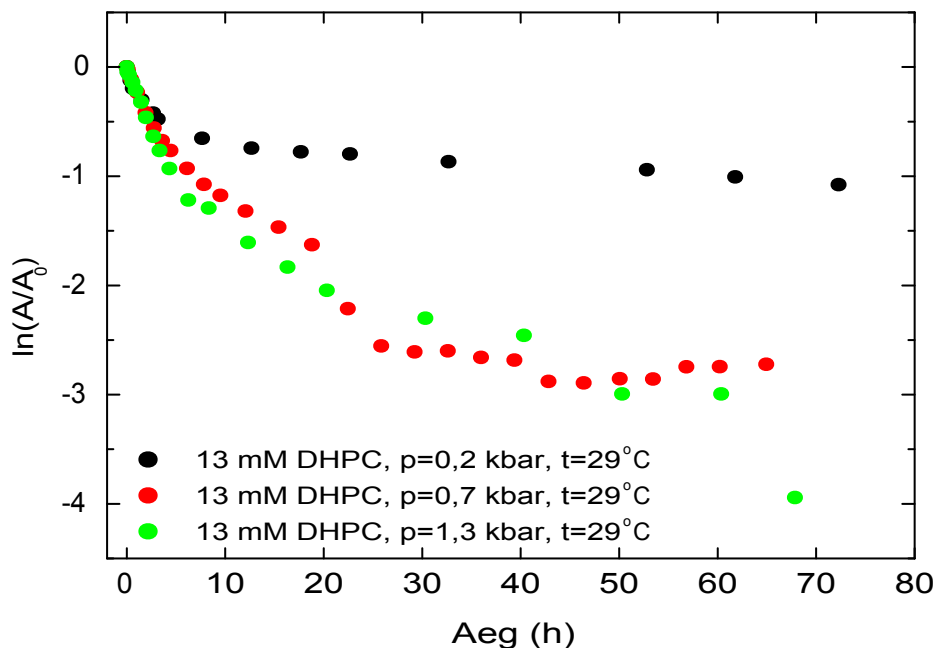
Eelmises peatükis järeldati, et LH1 dissotsiatsiooni mehhanism sõltub detergendi faasist. Ühe eristatava astme moodustavad 2,1 kbar ja kõrgema rõhu juures tehtud katsete tulemused. Nende lähem analüüs näitab, et reaktsiooni mehhanism vastab I järku reaktsiooni kineetikale, sest spektrialune suhteline pindala on ajas lineaarne naturaallogaritm skaalas (vt joonist 11). Oligomeerse vees lahustuva valgu Cpn60 dissotsiatsioon 14 monomeeriks järgis samuti I järku reaktsiooni kineetikat (Gorovits, Raman ja Horowitz 1995).

Käesoleval juhul on aga tegemist pseudo-I järku reaktsiooniga, sest lähteaineks on lisaks LH1-le detergent DHPC. LH1 dissotsiatsioonireaktsiooni kirjeldab võrrand $B875 + nDHPC \rightleftharpoons 16B820$, kus n on stöhhiomeetriline konstant. Kuna aga detergendi kontsentratsioon on valgu suhtes suures liias (vt peatükk 4.1), ei mängi see reaktsiooni kineetika seisukohast rolli. Detergendi piisavat liiasust tõestab ka 10 mM DHPC kontsentratsiooniga tehtud võrdluskatse tulemus: selle, 2,5 kbar juures tehtud katse tulemused on täiesti kooskõlas teiste üle 2 kbar juures tehtud katsete tulemustega. Ainus reaktsiooni kineetikat mõjutav faktor nendes katsetes on rõhk, kuna temperatuur on hoitud konstantselt 29 °C juures.



Joonis 11. Kahest kbar-st kõrgemate rõhkude juures toimub LH1 dissotsiatsioon pseudo-I järku reaktsiooni mehhanismi alusel.

Alla 2 kbar juures toimunud dissotsiatsioonireaktsioonid ei allu enam pseudo-I järku reaktsiooni mehhanismile, sest B875 suhtelise pindala naturaallogaritm ei sõltu ajast lineaarselt (vt joonis 12). See tähendab, et dissotsiatsiooni mehhanism on keerulisem ning tegu on kõrgemat järku reaktsioonidega. LH1 dissotsiatsioon dimeeriks toimub siin arvatavasti vaheastme(te)ga, nt üle tetrameeri B851 (Végh ja Robert 2002; Pandit *et al.* 2003).

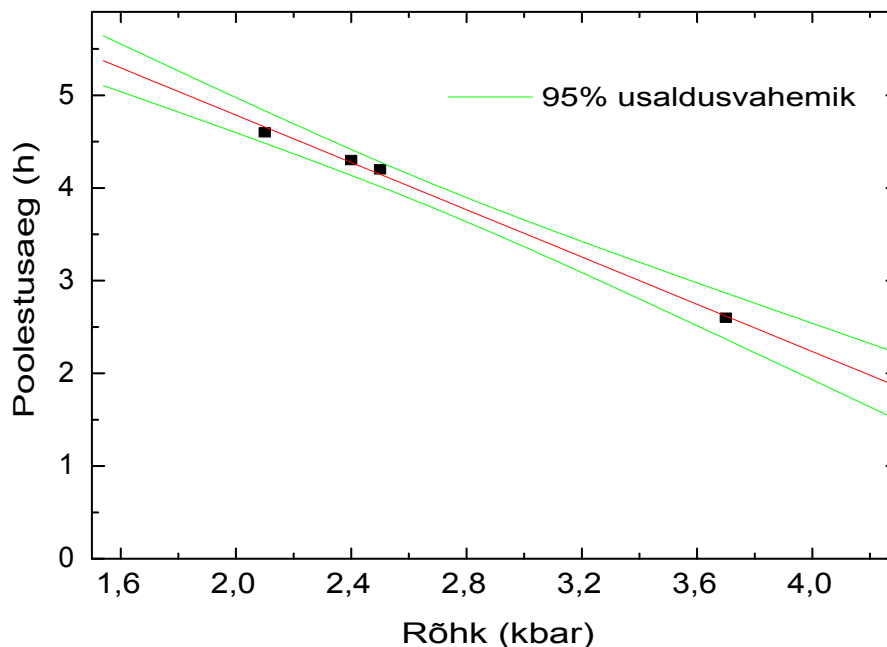


Joonis 12. Kõrgemat järku reaktsioonid. 1,3 kbar ja madalama rõhu juures ei toimu dissotsiatsioon enam pseudo-I järku reaktsiooni mehhanismi alusel, sest naturaallõgaritmi skaalas ei teki lineaarset seost.

4.2.4 Kineetilised parameetrid

Üle 2 kbar juures toimunud pseudo-I järku reaktsiooni jaoks on võimalik leida dissotsiatsiooni kineetikat iseloomustavad parameetrid: reaktsiooni poolestusaeg $\tau_{1/2}$, reaktsiooni näiv kiiruskonstant normaaltingimustel ($p=1 \text{ atm}$, $t=25 \text{ °C}$) k_0 , aktivatsiooniruumala ΔV^\ddagger ja aktivatsiooni vaba energia ΔG^\ddagger .

Joonisel 11 kujutatud sirgete tõusud annavad dissotsiatsioonireaktsiooni rõhust sõltuvad kiiruskonstandid k_p . Kiiruskonstandi abil on võimalik leida reaktsiooni poolestusaeg $\tau_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_p}$, mille sõltuvus rõhust on kujutatud joonisel 13. Nagu näha, on poolestusaja ja rõhu seos lineaarne, kusjuures rõhu tõusuga poolestusaeg lüheneb. Seega kõrgematel rõhkudel toimub reaktsioon kiiremini.



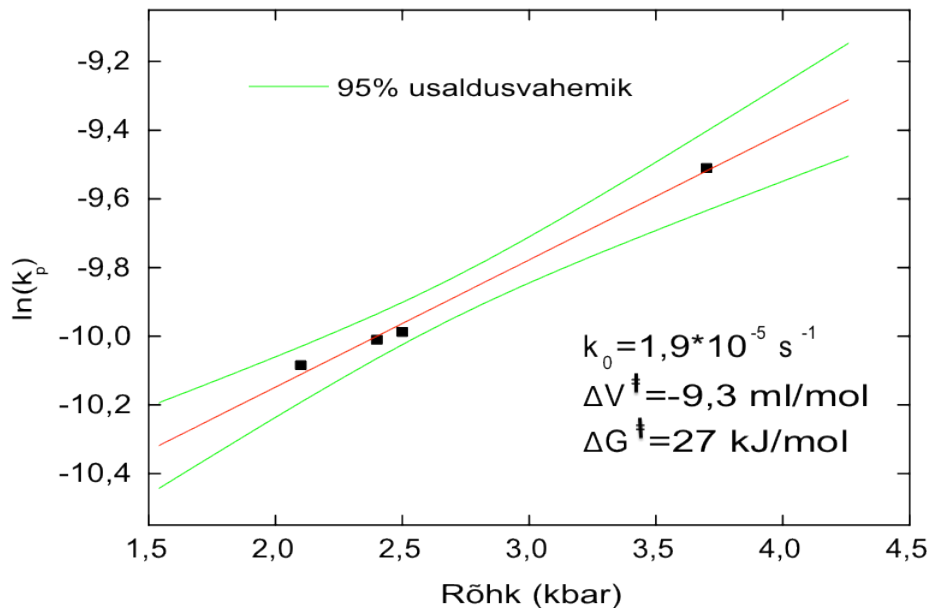
Joonis 13. Poolrestusaja sõltuvus rõhust. 2,1–3,7 kbar vahemikus kahaneb poolrestusaeg rõhu suurenedes lineaarselt.

Tuleb aga märkida, et niisugune seos kehtib vaid ~2–4 kbar vahemikus. Kõrgemate rõhkude jaoks puuduvad hetkel andmed, mistõttu ei saa välistada, et rõhu edasisel kasvul reaktsioon aeglustub, kuna molekulide liikumisvabadus võib rõhu all väheneda, või toimub detergendi faasisiirdest tulenev dissotsiatsiooni mehhanismi muutus (vt peatükk 2.2.3.1).

Joonisel 14 on kujutatud $\ln(k_p)$ sõltuvus rõhust, mille abil on võimalik leida reaktsiooni aktivatsiooni vaba energia ΔG^\ddagger ja aktivatsiooniruumala ΔV^\ddagger arvestatuna ühe mooli vaheühendi kohta. Aktivatsiooni vaba energia ΔG^\ddagger on reaktsiooni energeetilise barjääri kõrgus: see iseloomustab energiat, mis peab olema 1 moolil lähteainel, et ületada kõrgema energiaga vaheühendi poolt tekitatud barjäär reaktsiooni toimumisele. Aktivatsiooniruumala ΔV^\ddagger tähistab vaheühendi ja lähteainete osaliste molaarruumalade vahet ja iseloomustab reaktsiooni kiiruskonstandi muutumist rõhu all: kui ΔV^\ddagger on negatiivne, reaktsioon kiireneb rõhu toimetel.

Seosest $-RT \ln(k_p) = \Delta G^\ddagger + \Delta V^\ddagger p$ (kus R tähistab universaalset gaasikonstanti, T absoluutset temperatuuri ja p rõhku), saab sirge vabaliikme A abil avaldada $\Delta G^\ddagger = -RTA$.

Sirge tõusu B kaudu on leitav reaktsiooni aktivatsiooniruumala $\Delta V^\ddagger = RTB$. Samuti on võimalik leida reaktsiooni näiv kiiruskonstant normaaltingimustel $k_0 = e^A$. k_0 väärtus on näiv, kuna reaktsiooni mehhanism normaaltingimustel on teistsugune kui 2–4 kbar vahemikus (vt peatükk 4.3.1).



Joonis 14. Kiiruskonstandi naturaallõgaritmi sõltuvus rõhust. 2,1–3,7 kbar vahemikus kasvab kiiruskonstandi naturaallõgaritm rõhust lineaarselt. Sirge tõusu kaudu saab leida aktivatsiooniruumala $\Delta V^\ddagger = -9,3 \text{ ml/mol}$ ja vabaliikme abil näiva kiiruskonstandi normaalrõhul $k_0 = 1,9 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ning aktivatsiooni vaba energia $\Delta G^\ddagger = 27 \text{ kJ/mol}$.

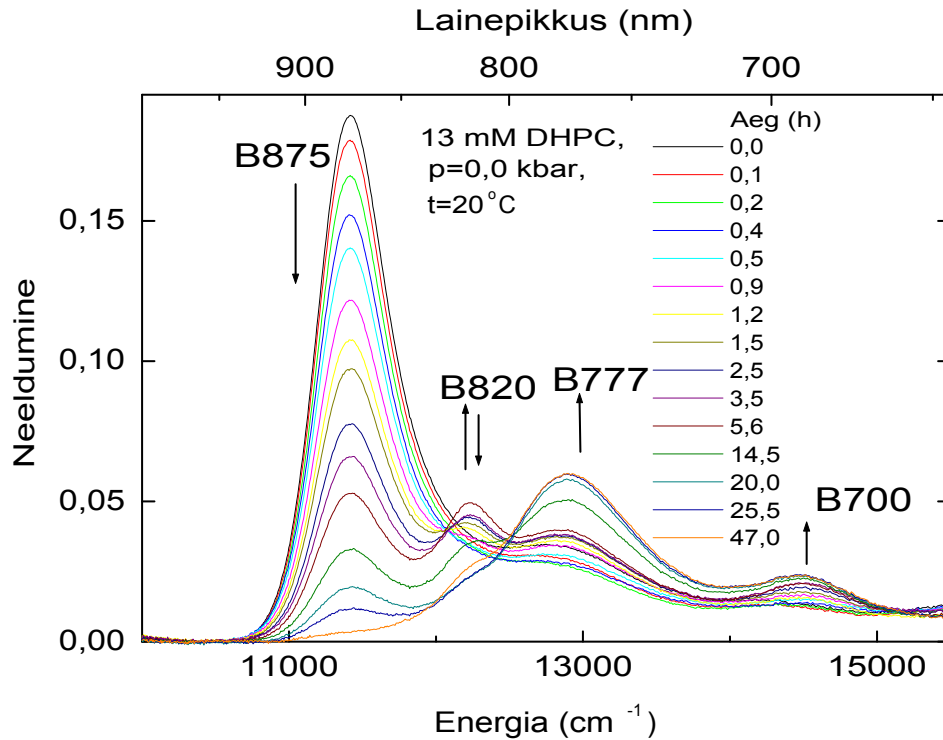
Pseudo-I järku reaktsiooni jaoks ~2–4 kbar vahemikus saadi tulemuseks, et näiv kiiruskonstant $k_0 = 1,9 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, aktivatsiooniruumala $\Delta V^\ddagger = -9,3 \text{ ml/mol}$ ja vaba energia $\Delta G^\ddagger = 27 \text{ kJ/mol}$. Negatiivne aktivatsiooniruumala on ootuspäraselt kooskõlas varem leitud LH1 poolestusaja vähenemisega rõhu toimet (vt joonist 13). Võrdluseks võib tuua Winteri ja Dzwolaki (2005) uuritud vees lahutuva monomeerse ensüümi SNaasi lahtipakkumise samuti negatiivse aktivatsiooniruumala -23 ml/mol .

4.3 LH1 dissotsiatsioon monomeeriks B777

4.3.1 Kaheastmeline dissotsiatsioon

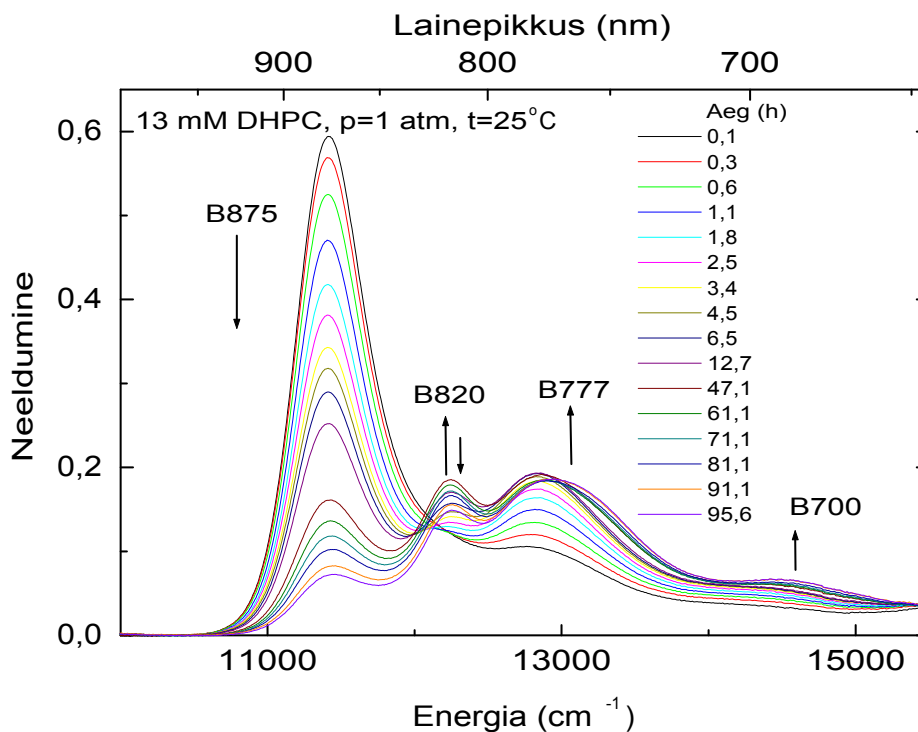
Lisaks juba eelnevalt kirjeldatud kõrge hüdrostaatilise rõhu katsetele (vt peatükk 4.2), sooritati mõõtmisi rõhurakus määrataval minimaalsel rõhul (0,0 kbar). Siinkohal tuleb meenutada, et rõhu mõõtemääramatus 95% usaldusnivool oli $\pm 0,1$ kbar, mis tähendab, et normaalrõhu ning 100 bar vahemikus ei ole kasutada olevate mõõtevahenditega võimalik rõhku täpsemini määrata.

Reas erinevatel temperatuuridel (15; 20; 25 ja 29 °C) sooritatud katsetes toimus LH1 dissotsiatsioon heterodimeerideks, kuid sellele järgnes omakorda B820 ning allesjäänud B875 dissotsiatsioon bakterklorofüllil monomeerideks B777 (vt joonist 15). Parkes-Loach, Riccobono ja Loach (1987) leidsid, et B777 erineb oma omadustelt vabast bakterklorofüllist, mille põhjal järeldati, et B777 näol on tegemist Bchl ja apoproteiini kompleksiga. Hilisemad tööd (Végh, A. P. ja Robert. B. 2002) on kinnitanud, et Bchl on seotud kas α - või β -apoproteiiniga ($\alpha_1\text{Bchl}_1$ või $\beta_1\text{Bchl}_1$). Seega toimus LH1 kaheastmeline dissotsiatsioon bakterklorofüllist ja valgust koosnevateks monomeerideks. Samal ajal kasvas ka oksüdeeritud bakterklorofüllile vastava B700 neeldumine.



Joonis 15. Kaheastmeline dissotsiatsioon. B875 esialgsele dissotsiatsioonile B820-ks järgnes nii LH1 kui ka dimeeri dissotsiatsioon monomeeriks B777. Katse jooksul kasvas ka B700 e oksüdeeritud bakterklorofüllü intensiivsus. Mõõtmise toimus minimaalse rõhu (0,0 kbar) juures.

Tingimuste täpsustamiseks ja suurema selguse saavutamiseks, eelkõige pidades silmas rõhu suurt mõõtemääramatust, otsustati uurida ka LH1 dissotsiatsiooni detergendi toimet normaalarõhul ja ümbritseval temperatuuril 25 °C. Katse toimus suletud küvetis. Nelja ööpäeva jooksul mõõdetud neeldumisspektrid on kujutatud joonisel 16.



Joonis 16. LH1 neeldumine ajas mõõdetuna suletud küvetis normaalingimustel ($p=1$ atm, $t=25$ °C). B875 intensiivsus väheneb oluliselt, samas kui dimeeri B820 intensiivsus esialgu kasvab ning lõpuks samuti kahaneb. Katse jooksul kasvas ka B777 ehk monomeerse bakterklorofüllü intensiivsus, kuid kasv peatus lõpuks. Lisaks toimus oksüdeeritud bakterklorofüllü B700 aeglane kasv ajas.

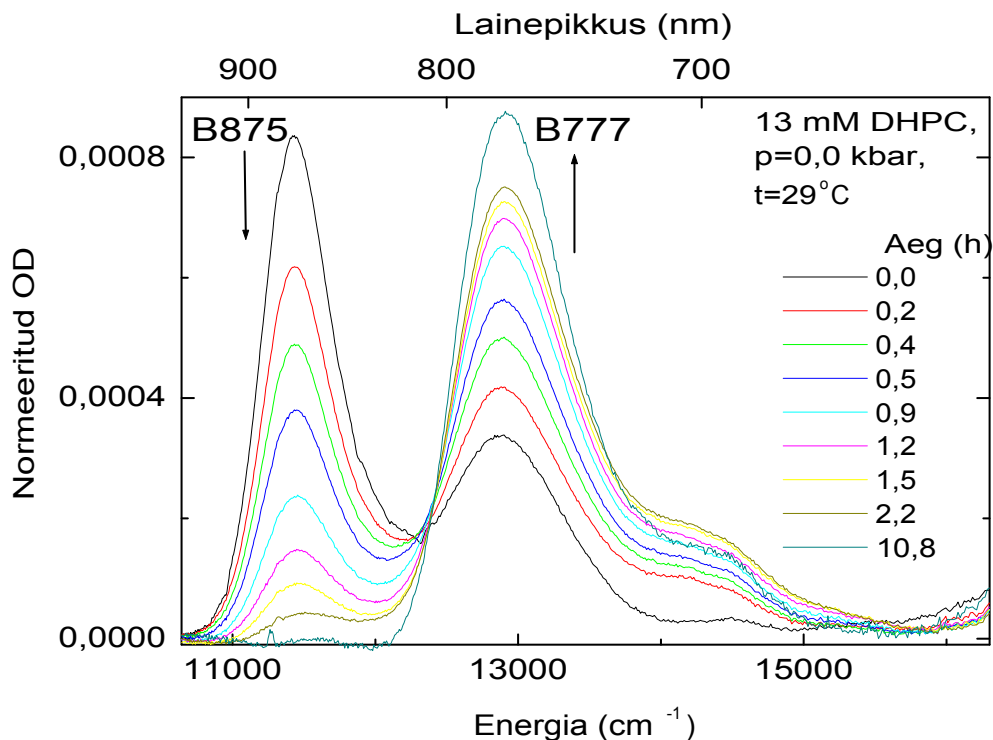
LH1 neeldumine vähenes 4 ööpäeva jooksul, kuid selle ajaga dissotsiatsioon lõpuni ei kulgenud. Esialgu toimus B820 intensiivsuse aeglane kasv, kuid see asendus kahe ööpäeva möödudes neeldumise kahanemisega. Katse vältel kasvas ka monomeersele bakterklorofüllile vastava B777 intensiivsus, kuid kasv peatus kahe ööpäeva järel. Lisaks toimus oksüdeeritud bakterklorofüllile vastava B700 intensiivsuse aeglane kasv. Spektritealuse pindala kahanemine ajas viitab LH1 või dissotsiatsiooniproductide lagunemisele.

Normaalingimustel saadud tulemused on lähedased minimaalsel rõhul toimunud kaheastmelisele dissotsiatsioonile (vt joonist 15). Erinevuseks on aga dissotsiatsiooni mitmekordne aeglustumine normaalarhul. Mõlemas katses on näha oksüdeeritud bakterklorofüllü B700 kasvu, mis viitab hapniku arvestatavale mõjule. Küvett oli küll pealt suletud, kuid proov oli õhukeskkonnas. Minimaalse rõhu all tehtud katsetes ei pruugi

rõhurakk samuti olla hermeetiliselt suletud ning LH1 või selle dissotsiatsiooniproduktid võisid õhuhapnikuga reageerida.

4.3.2 Vaheastmeta dissotsiatsioon

Minimaalse rõhu (0,0 kbar) tingimustes toimus lisaks kaheastmelisele dissotsiatsioonile LH1 dissotsiatsioon monomeeriks ilma vaheastme (dimeeri) kogunemise või tekkimiseta (vt joonist 17). Dissotsiatsioon monomeeriks B777 toimus väga kiiresti: umbes 10 tunniga oli kogu LH1 dissotsieerunud, samas kui heterodimeeri tekkimiseks ning ka kaheastmeliseks dissotsiatsiooniks kulus sama temperatuuri (29 °C) juures mitu ööpäeva.



Joonis 17. LH1 dissotsiatsioon monomeeriks B777. Katse toimus minimaalse rõhu juures ning vaheastmena kas ei moodustunud või ei kogunenud heterodimeeri B820. Optiline tihedus on normeeritud spektrialuse pindala järgi.

Monomeeri kiire tekkimise põhjuseks minimaalse rõhu juures on autori hüpoteesi kohaselt vee aurustumine proovist, mis suurendab detergendi suhtelist kontsentratsiooni. Hüpoteesi

kontrollimiseks tuleks sooritada katseid rõhurakuga ka kõrgema detergendi kontsentratsiooni juures. Parkes-Loach, Riccobono ja Loach (1987) näitasid, et kõrge oktüülglükosiidi kontsentratsiooni juures dissotsieerub *Rhodospirillum rubrum*'i LH1 väga kiiresti bakterklorofüllü monomeerideks B777, kusjuures reaktsioon on pöörduv – detergendi kontsentratsiooni lahjendades reassotsieerub B777 kõigepealt B820-ks ning seejärel juba LH1-ks.

Kõrge hüdrostaatilise rõhu all tehtud katsed näitasid, et LH1 dissotsieerub heterodimeeriks B820. Seevastu minimaalsel rõhurakuga mõõdetaval rõhul ($<0,1$ kbar) toimus nii LH1 dissotsiatsioon heterodimeeriks B820 ja sellele järgnenud dissotsiatsioon monomeeriks B777 kui ka otsene dissotsiatsioon monomeeriks. Minimaalse rõhu juures esinenud dissotsiatsioonimehhanismide erinevust teineteisest ning kõrge rõhu all sooritatud katsetest võib selgitada eelnevalt välja toodud rõhu määramatus. Ei saa välistada, et 1–100 bar vahemikus toimub nt detergendi faasi üleminek (vt peatükke 2.2.3.1 ja 4.2.2). Lisaks tuleb arvestada õhuhapnikuga reageerimisest ning proovi aurustumisest tulenevate efektidega. Senised tulemused näitavad, et LH1 dissotsiatsioon alla 0,1 kbar juures on keeruline ning oleks vaja sooritada lisakatseid täpsemate mõõtevahenditega, et selgitada, missugustel tingimustel ja missuguste vaheetappidega toimub dissotsiatsioon monomeeriks.

Kokkuvõte

Käesoleva töö esimene eesmärk oli tõestada hüpotees, et kõrge hüdrostaatilise rõhu toimele leiab aset *Rhodobacter sphaeroides*'e valgust neelava kompleksi I (LH1) dissotsiatsioon heterodimeeriks B820. Selle eesmärgi täitmiseks korraldati rõhumõõtmiste katseseeria, mille tulemused kinnitavad, et oligomeerne LH1 dissotsieerub kõrge rõhu all B820 ühikuteks.

Esialgsete tulemuste analüüsi põhjal võib järeldada, et LH1 dissotsiatsiooni mehhanism sõltub kasutatud detergendi 1,2-diheptanoüül-*sn*-glütsero-3-fosfokoliini (DHPC) faasist. Järeldus on kooskõlas analoogsete ühendite uurimisel saadud tulemustega (Kaneshina *et al.* 2002; Matsuki *et al.* 2002), kuid visuaalselt detergendi faasiüleminekut tuvastada ei olnud võimalik.

Üle 2 kbar juures vastab LH1 dissotsiatsiooni mehhanism pseudo-I järku reaktsioonile. Alla 2 kbar juures on tegemist kõrgemat järku reaktsioonidega. Pseudo-I järku reaktsiooni kineetika uurimisel saadi tulemuseks, et LH1 poolestusaeg kahaneb rõhu toimele lineaarselt. Seega 2–4 kbar vahemikus rõhu kasvades dissotsiatsioon kiireneb. Leiti ka reaktsiooni iseloomustavad kineetilised parameetrid: näiv kiiruskonstant $k_0 = 1,9 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, aktivatsiooniruumala $\Delta V^\ddagger = -9,3 \text{ ml/mol}$ ja aktivatsiooni vaba energia $\Delta G^\ddagger = 27 \text{ kJ/mol}$.

Minimaalsel rõhurakuga määrataval rõhul (<0,1 kbar) tehtud katseseeria tulemused näitasid, et heterodimeer võib omakorda dissotsieeruda monomeeriks B777. Normaalarõhul tehtud kontrollkatse tulemused kinnitavad, et LH1 dissotsiatsioon võib madalatel rõhkudel toimuda kahes astmes. Lisaks kaheastmelisele dissotsiatsioonile toimus minimaalse rõhu all LH1 dissotsiatsioon monomeeriks ka ilma vaheastme (B820) kogunemiseta. Erinevusi reaktsioonimehhanismis võivad selgitada proovi aurustumisest tulenev detergendi kontsentratsiooni kasv, õhuhapniku ligipääs proovile ja rõhu määramatus $\pm 0,1 \text{ kbar}$.

Käesolevas töös on tõstatatud mitu edasist uurimist vajavat küsimust. Autorit huvitab, kuidas kulgeb reaktsioon üle 4 kbar juures ning missugused mehhanismid toimivad LH1 dissotsiatsioonil dimeeriks alla 2 kbar rõhkudel. Lisaks on oluline välja selgitada B820 neeldumisspektri täpne kuju, et analüüsida reaktsiooni heterodimeeri tekkimise seisukohalt.

Kinnitamist vajab hüpotees detergendi DHPC faasiülemikutest. Detergendi rolli täiendavaks selgitamiseks peaks uurima DHPC kontsentratsiooni mõju monomeeride tekkimisele.

Tänuavaldused

Ma sooviksin tänada Tartu Ülikooli Füüsika instituuti, kes tunnustas käesolevat tööd 2012.–2013. õppeaasta tudengistipendiumi konkursil II preemiaga.

Ülivõrdelised tänusõnad on ära teeninud minu suurepäraseid juhendajad Liina Kangur ja prof Arvi Freiberg. Veel sooviksin tänada kolleege biofüüsika laborist, kes abistasid aparatuuri kasutamisel ja muude tehniliste küsimuste lahendamisel, eriti tõstaksin esile Kristjan Leigeri ja Margus Rätsepa panust.

Kindlasti tahan tänada Kristel Koske, kes abistas mind töö vormistamisel.

Lõpuks soovin tänada oma vanemaid, kelle toel olen saanud täielikult õpingutele pühenduda, ning oma elukaaslast, kes on olnud äärmiselt toetav, kannatlik ning abistav.

High hydrostatic pressure induced dissociation of oligomeric light-harvesting complex LH1 from *Rhodobacter sphaeroides*

Marit Puusepp

Summary

The aim of the current paper was to investigate hydrostatic pressure effects on the light-harvesting complex I (LH1) from *Rhodobacter sphaeroides*. *Rb. sphaeroides* is a purple non-sulphur photosynthetic bacterium. Purple bacteria present an ideal model to research the origin and evolution of photosynthetic organisms from the first bacteria that inhabited the hydrothermal vents in the depths of the oceans 4 billion years ago (Daniel, Oger and Winter 2006).

It was hypothesized that under pressure, oligomeric LH1 dissociates into heterodimeric subunits. A series of high pressure experiments were performed using the diamond anvil cell (D-02, Diacell Products Ltd) to confirm this hypothesis. The absorbance spectra of LH1 were measured (Shamrock SR-303i Spectrograph with CCD camera, Andor Technology) over a period of several days for each experiment. Microscopic spherical ruby crystals (RSA Le Rubis SA) were used to detect the pressure in the cell: a CCD camera attached to Jobin-Yvon TH150 Spectrograph (Andor Technology) measured the emission spectra of the rubies.

Results proved that under high pressure LH1 dissociates into heterodimers B820. The mechanism of dissociation appears to depend on the phase of the detergent 1,2-diheptanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DHPC) that the LH1 sample was isolated in. This hypothesis is based on analogy with lipids (Kaneshina *et al.* 2002; Matsuki *et al.* 2002). A confirmation test was planned using a camera (Olympus ColorView IIIu) attached to a microscope (Olympus IX71). Phase transitions were not, however, visually distinguishable.

Under pressures of 2–4 kbar, the dissociation mechanism of LH1 corresponded to a pseudo-1st-order reaction. The reaction was characterized by kinetic parameters: apparent reaction rate at atmospheric pressure $k_0=1,9 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, activation volume $\Delta V^\ddagger=-9,3 \text{ ml/mol}$ and free

energy of activation $\Delta G^\ddagger=27$ kJ/mol. Under less than 2 kbar pressure the reaction mechanism for dissociation was more complex and could not be described by 1st-order kinetics.

A series of experiments were also conducted under minimal pressure detectable in the diamond anvil cell (<0,1 kbar). These showed that the dimers could further dissociate into monomers B777. A test performed under atmospheric pressure in a cuvette confirmed that under pressures lower than 100 bar, LH1 may dissociate via a two-step mechanism resulting in monomers. In other experiments conducted under minimal pressure, LH1 dissociated into monomers directly without the dimer accumulating. The variation in results could be explained by the measurement uncertainty of pressure ($\pm 0,1$ kbar). Effects of oxygen should also be considered as the absorbance of oxidized bacteriochlorophyll B700 increased in time throughout the two-step dissociation spectra. Water evaporating from the LH1 sample due to non-hermetic conditions, may have resulted in higher detergent concentrations. According to Parkes-Loach, Riccobono and Loach (1987), high detergent concentrations can lead to the direct dissociation of LH1 into monomers.

Problems to solve in future research include the dissociation mechanism under pressures of over 4 kbar and reaction order of the dissociation under less than 2 kbar pressure. The proposed detergent phase transitions need further investigation, as well as the dissociation of LH1 into monomers with higher DHPC concentrations. Also, the B820 absorbance spectra needs to be determined to analyze the dissociation process from the standpoint of dimer production.

Kasutatud kirjanduse loetelu

- Bahatyrova, S., Frese, R. N., van der Werf, K. O., Otto, C., Hunter, C. N., Olsen, J. D. (2004), "Flexibility and Size Heterogeneity of the LH1 Light Harvesting Complex Revealed by Atomic Force Microscopy," *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 21327–21333.
- Boonyaratanakornkit, B. B., Park, C. B. ja Clark, D. S. (2002), "Pressure effects on intra- and intermolecular interactions within proteins," *Biochimica et Biophysica Acta* **1595**, 235–249.
- Brindley, A. A., Pickersgill, R. W., Partridge, J. C., Dunstan, D. J., Hunt, D. M., ja Warren, M. J. (2008), "Enzyme Sequence and Its Relationship to Hyperbaric Stability of Artificial and Natural Fish Lactate Dehydrogenases," *PLoS ONE* **3**, e2042.
- Chang, M. C., Meyer, L. ja Loach, P. A. (1990), "Isolation and characterization of a structural subunit from the core light-harvesting complex of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 and *puc705*-BA," *Photochemistry and Photobiology* **52**, 873–881.
- Cogdell, R. J., Gall, A., Köhler, J. (2006), "The architecture and function of the light-harvesting apparatus of purple bacteria: from single molecules to *in vivo* membranes," *Quarterly Reviews of Biophysics* **39**, 227–324.
- Daniel, I., Oger, P., Winter, R. (2006), "Origins of life and biochemistry under high-pressure conditions," *Chemical Society Reviews* **35**, 858–875.
- Erauso, G., Reysenbach, A.-L., Godfroy, A., Meunier, J. R., Crump, B., Parensky, F., Baross, J. A., Marteinsson, V. T., Barbier, G., Pace, N. R. ja Prieur, D. (1993), "*Pyrococcus abyssi* sp. nov., a new hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent," *Archives of Microbiology* **160**, 338–349.
- Freiberg, A. (2006), "Biofüüsika – varjust valguse kätte," kogumikus *Teadusmõtte Eestis. Täppisteadused*, Koppel, I., Saari, P., vastutavad toimetajad. (Eesti Teaduste Akadeemia), lk. 101–109.

- Freiberg, A., Kangur, L., Olsen, J. D., Hunter, C. N. (2012), "Structural implications of hydrogen bond energetics in membrane proteins revealed by high-pressure spectroscopy," *Biophysical Journal* **103**, 2352–2360.
- Ghosh, R., Hauser, H. ja Bachofen, R. (1988), "Reversible Dissociation of the B873 Light-Harvesting Complex from the *Rhodospirillum rubrum* G9+," *Biochemistry* **27**, 1004–1014.
- Gorovits, B., Raman, C. S. ja Horowitz, P. M. (1995), "High Hydrostatic Pressure Induces the Dissociation of cpn60 Tetradecamers and Reveals a Plasticity of the Monomers," *Journal of Biological Chemistry* **270**, 2061–2066.
- Grasset, O. (2001), "Calibration of the R ruby fluorescence lines in the pressure range [0–1 GPa] and the temperature range [250–300 K]," *High Pressure Research* **28**, 75–126.
- Hauser, H. (2000), "Short-chain phospholipids as detergents," *Biochimica et Biophysica Acta* **1508**, 164–181.
- Hu, X., Ritz, T., Damjanovic, A., Autenrieth, F., Schulten, K. (2002), "Photosynthetic apparatus of purple bacteria," *Quarterly Reviews of Biophysics* **35**, 1–62.
- Hu, X., Schulten, K. (1998), "Model for the Light-Harvesting Complex I (B875) of *Rhodobacter sphaeroides*," *Biophysical Journal* **75**, 683–694.
- Johnson, F. H. ja ZoBell, C. E. (1949), "The acceleration of spore disinfection by urethan and its retardation by hydrostatic pressure," *Journal of Bacteriology* **57**, 359–362.
- Kaneshina, S., Matsuki, H., Kusube, M. ja Ichimori, H. (2002), "Effects of *Cis* and *Trans* Unsaturation on the Barotropic and Thermotropic Phase Behaviour of Phospholipid Bilayers," kogumikus *Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology II*, Winter, R., toimetaja. (Springer, Berliin).
- Kangur, L. (2011), trükis avaldamata materjal.
- Matsuki, H., Kusube, M., Hata, T. ja Kaneshina, S. (2002), "Barotropic and Thermotropic Phase Behaviour of Bilayer Membranes Composed of Phospholipids Containing *Cis*

Double Bond in the *sn*-2 Acyl Chain,” kogumikus *Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology II*, Winter, R., toimetaja. (Springer, Berliin).

Neuman, R. C. Jr, Kauzmann, W. ja Zipp, A. (1973), “Pressure Dependence of Weak Acid Ionization in Aqueous Buffers,” *Journal of Physical Chemistry* **77**, 2687–2691.

Oger, P. M. ja Jebbar, M. (2010), “The many ways of coping with pressure,” *Research in Microbiology* **161**, 799–809.

Ohmae, E., Murakami, C., Gekko, K. ja Kato, C. (2007), “Pressure Effects on Enzyme Functions,” *International Journal of Biological Macromolecules* **7**, 23–29.

Pandit, A., van Stokkum, I. H. M., Georgakopoulou, S., van der Swan, G. ja van Grondelle, R. (2003), “Investigations of intermediates appearing in the reassociation of the light-harvesting 1 complex of *Rhodospirillum rubrum*,” *Photosynthesis Research* **75**, 235–248.

Parkes-Loach, P., Riccobono, J. ja Loach, P. (1987), “Preparation of subunit forms of the light-harvesting complex of *Rhodospirillum rubrum*,” *Progress in Photosynthesis Research* **2**, 25–28.

Robb, F. T. ja Clark, D. S. (1999), “Adaptation of Proteins from Hyperthermophiles to High Pressure and High Temperature,” *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **1**, 101–105.

Seddon, A. M., Curnow, P. ja Booth, P. J. (2004), “Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera,” *Biochimica et Biophysica Acta* **1666**, 105–117.

Silva, J. L. ja Weber, G. (1993), “Pressure Stability of Proteins,” *Annual Review of Physical Chemistry* **44**, 89–113.

Sturgis, J. N., Hunter, C. N. ja Niederman, R. A. (1988), “Spectra and extinction coefficients of near-infrared absorption bands in membranes of *Rhodobacetr sphaeroides* mutants lacking light-harvesting and reaction center complexes,” *Photochemistry and Photobiology* **48**, 243–247.

Végh, A. P. ja Robert. B. (2002), “Spectroscopic characterization of a tetrameric subunit form of the core antenna protein from *Rhodospirillum rubrum*,” Federation of European Biochemical Societies Letters **528**, 222–226.

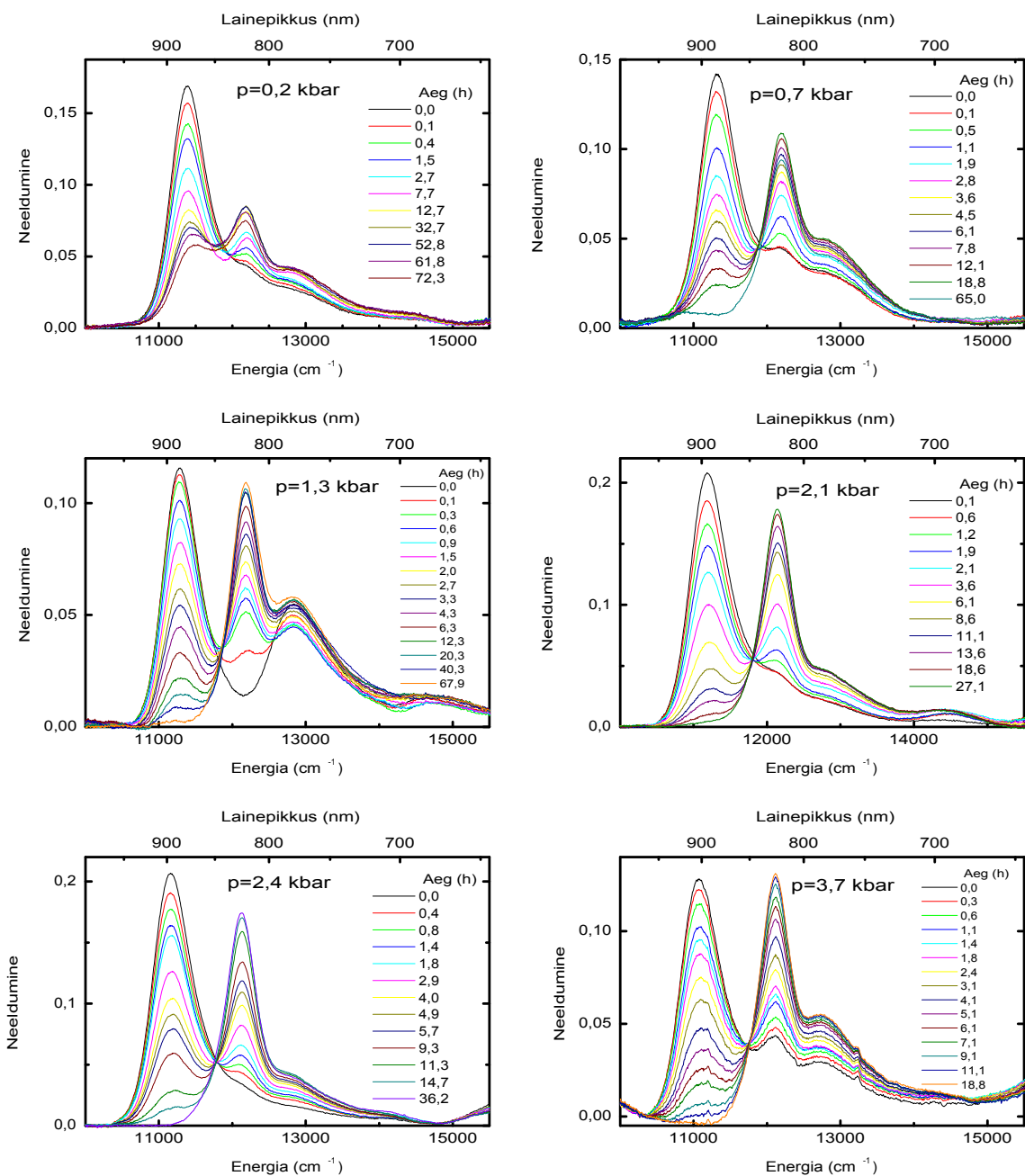
Visschers, R. W., Nunn, R., Calkoen, F., van Mourik, F., Hunter, C. N., Rice, D. W. ja van Grondelle, R. (1992), “Spectroscopic characterization of B820 subunits from light-harvesting complex I of *Rhodospirillum rubrum* and *Rhodobacter sphaeroides* prepared with the detergent *n*-octyl-*rac*-2,3-dipropylsulfoxide,” Biochimica et Biophysica Acta **1100**, 259–266.

Wang, Z.-Y., Muraoka, Y., Nagao, M., Shibayama, M., Kobayashi, M. ja Nozawa, T. (2003), “Determination of the B820 Subunit Size of a Bacterial Core Light-Harvesting Complex by Small-Angle Neutron Scattering,” Biochemistry **42**, 11555–11560.

Winter, R. ja Dzwolak, W. (2005), “Exploring the temperature–pressure configurational landscape of biomolecules: from lipid membranes to proteins,” Philosophical Transactions of the Royal Society **363**, 537–563.

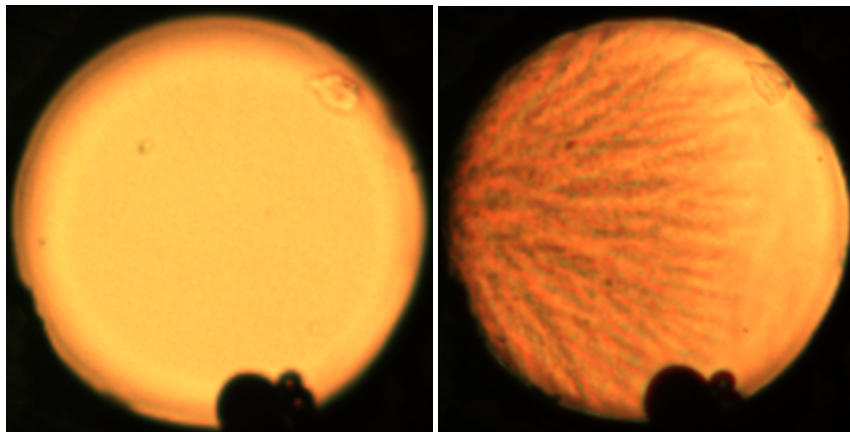
Lisa 1. LH1 neeldumisspektrid

LH1 neeldumisspektrite muutus ajas konstantse detergendi (DHPC) 13 mM kontsentratsiooni ja 29 °C temperatuuri juures. Rõhk on eraldi märgitud iga katse graafikule.



Lisa 2. Oktüülglükosiidi faasiüleminek

Vasakul on kujutatud rõhuraku minimaalsel rõhul tehtud foto, paremal 6 kbar juures tehtud pilt; allikas: Kangur (2011).



Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Marit Puusepp (sünnikuupäev: 15.08.1989)

annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

“*Rhodobacter sphaeroides*’e oligomeerse valgust neelava kompleksi LH1 dissotsiatsioon kõrge hüdrostaatilise rõhu toimet”,

mille juhendajad on MSc Liina Kangur ja prof Arvi Freiberg,

1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace’i lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace’i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
3. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus **27.05.2013**